**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**O genótipo do hospedeiro e as condições ambientais como
moduladores da comunidade bacteriana associada**

Pedro Avelino Maia de Andrade

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2017**

Pedro Avelino Maia de Andrade
Engenheiro Agrônomo

**O genótipo do hospedeiro e as condições ambientais como moduladores da
comunidade bacteriana associada**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Andrade, Pedro Avelino Maia de

O genótipo do hospedeiro e as condições ambientais como moduladores da comunidade bacteriana associada / Pedro Avelino Maia de Andrade. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - - - Piracicaba, 2017.

94 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Padrões de associação 2. Microrganismo-hospedeiros 3. *Anthurium alcatrazense* 4. Cianobactérias 5 Comunidade bacteriana I. Título

DEDICO

Aos meus familiares,
Hamilton, Mariza (pais), Marina (irmã), João Victor (filho),
Priscila (namorada) e seus microrganismos,
meus holobiontes favoritos.

OFEREÇO

*Aos leitores,
que desfrutem dos novos conhecimentos
colocados neste trabalho,
Transforme-os em novas ideias.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Hamilton Avelino Medeiros de Andrade e Mariza Maia de Andrade, pelo amor incondicional, confiança e pela compreensão nos meus momentos de ausência. Acho que sem eles nada seria possível, pois eles são meu alicerce de vida.

À minha irmã, Dra. Marina Maia de Andrade, pela amizade, confiança e lealdade, caráter, competência, características que admiro.

Ao meu filho João Victor Viégas de Andrade, pelo amor e compreensão pela minha ausência. O meu sucesso refletirá diretamente em você e é por isso que luto por ele.

À minha namorada Priscila Alves Giovani e minha sogra Carmem Ferreira Alves pelo carinho, amor, apoio e compreensão nos momentos difíceis, e todo apoio na redação da minha tese e dos artigos.

A todos os meus familiares, por acreditarem em mim e entenderem minha ausência. A família é o bem mais precioso do mundo.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de estudar em uma das melhores Universidades do Brasil e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade e total disponibilização de recursos e infraestrutura para conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela confiança e paciência durante todos esses anos de convivência desde o período de Estágio supervisionado, Mestrado até Doutorado. Exemplo de profissional, tratando os problemas com garra, sabedoria, otimismo, caráter, dedicação, perseverança e transparência. Admiro bastante, sua carreira profissional.

Aos Professores Roberto Gomes de Souza Berlinck e Simone Possedente de Lira, Marco Antônio de Assis e a Dra. Leticia Poli pelo convite para participar do projeto Fapesp (processo 2013/50228-8) e também pelo apoio e dedicação para realização das coletas, toda estruturação do projeto e identificação morfológica das plantas de *Anthurium*.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela, colaboração e disponibilização das linhagens de cianobactérias e toda a sua estrutura de laboratório. Também à Dra. Ana Paula Dini Andreote, pela paciência, conversas, colaboração, apoio e dedicação no desenvolvimento do terceiro capítulo.

À Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral, uma pessoa incomparável, merecedora de todos os elogios, por sua garra, determinação e competência a frente do LGBM-Garanhuns.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola em especial a coordenação do curso por todos os ensinamentos ao longo destes quatro anos e o apoio pleno à iniciativa de criar o Simpósio de Microbiologia ESALQ-USP, o qual, para minha felicidade continua sendo organizado com muita dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo, (142344/2013-3), concedida.

À Marinha do Brasil, à todos os funcionários ICMBio (Estação Ecológica Tupinambás) pelo apoio logístico nas expedições ao Arquipélago de Alcatrazes. Também ao mateiro “Beto”, pelo apoio nas coletas. Meu muito obrigado.

Ao Professor Dr. Itamar Soares de Melo por gentilmente ceder espaço para realização do sequenciamento de DNA, além das boas risadas em nossas conversas. Ao Dr. Rodrigo Taketani, pelo auxílio na realização do sequenciamento. A todo o pessoal da Embrapa, Leonardo Silva, Suikinai, Danilo Tosta, Josiane, Camila, Laura, Martinha, obrigado pelas discussões científicas, cafezinhos e boas risadas.

Aos meus parceiros de publicação Natália Polesi, Daniela Vega, Daniel Meyer, Paulo Lopes, Ana Justiniano, Mariana Delgado, Elízio, Jessica Moretto, Franciele, Gabriela Ferraz, Marcia Leite, obrigado pela confiança, conselhos e risadas.

Aos grandes amigos que fiz na comissão de seminários, Bruno Souza, Felipe e Gislaine e principalmente Leonardo Silva, o qual compartilhou comigo várias ideias desde o início da estruturação do Simpósio de Microbiologia Agrícola. Obrigado por acreditarem que seria possível, realizarmos o simpósio. Parabéns por serem pessoas tão dedicadas à uma causa.

Aos grandes amigos, Diogo Costa, Arthur Prudêncio, Adijailton Souza, Bruno, Timóteo, obrigado pelo, apoio, risadas e zueiras.

A todos meus amigos do laboratório/salinha, “Polé” (Marcus Venicius), Alessandra (amiguinho), Daniele, Juliana, Dorotéia, Bruna, Victor Pylro, Kelly, Lucas Dantas, Michelle, Joelma, Fabio (Dig), Julia Perim, Ademir, Thiago, Cátia, Luana, Yasmin e German, obrigado pelas risadas e momentos de descontração e os churrascos. Especialmente à Armando Dias e Simone Cotta (partners), companheiros super especiais, “pau para toda obra”. Obrigado por tudo.

À três pessoas, as quais, também tenho profunda admiração, Fernando Baldesin, Denise Mescolotti e Sonia Pires, nunca foram apenas técnicos de laboratórios, são exemplo de caráter, competência e dedicação. Obrigado por tudo.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Pedro Andrade

“Para se descobrir novas terras, deve-se estar disposto a perder a terra de vista por um longo tempo. ”

André Gide

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para consegui-lo. ”

Dalai Lama

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências.....	18
2 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM PLANTAS ENDÊMICAS E NÃO ENDÊMICAS DO GÊNERO <i>ANTHURIUM</i> spp.	21
Resumo	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução	22
2.2 Materiais e Métodos.....	24
2.2.1 Locais de amostragem	24
2.2.2 Material coletado	26
2.2.3 Extração do DNA total	29
2.2.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA total via <i>Ion Torrent</i>	29
2.2.5 Análise das sequências	30
2.2.6 Análises estatísticas estrutura da comunidade bacteriana associada	31
2.3 Resultados	32
2.3.1 Riqueza e diversidade da comunidade bacteriana associada as plantas do gênero <i>Anthurium</i>	32
2.3.2 Diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana nas diferentes espécies de <i>Anthurium</i> spp.....	33
2.3.3 Composição taxonômica da comunidade bacteriana associada as plantas de <i>Anthurium</i> spp.....	34
2.3.4 Grupos bacterianos responsáveis pela diferenciação das comunidades bacterianas associadas à <i>Anthurium</i> spp.	37
2.4 Discussão	38
2.4.1 Relação entre a composição e estrutura da comunidade bacteriana associada a plantas endêmicas e seus parentes do mesmo gênero.....	41
Referências.....	47
3 IMPORTÂNCIA DA FILOGENIA E DO AMBIENTE NA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A CIANOBACTÉRIAS.....	53
Resumo	53
Abstract.....	53
3.1 Introdução	54

3.2	Material e Métodos	56
3.2.1	Linhagens de cianobactérias utilizadas.....	56
3.2.2	Extração do DNA e sequenciamento massivo da região V6 do gene 16S rRNA e análises das sequências.....	58
3.2.3	Análise de correlação entre a filogenia das cianobactérias e a estrutura da comunidade bacteriana associada	59
3.2.4	Variação das comunidades bacterianas associadas ao longo do cultivo das cianobactérias	59
3.2.5	Variações nas condições de cultivo das cianobactérias.....	60
3.3	Resultados.....	61
3.3.1	Alfa e beta-diversidade das comunidades bacterianas associadas aos gêneros de cianobactérias	61
3.3.2	Composição taxonômica da comunidade bacteriana associada as cianobactérias	62
3.3.3	Relação filogenética entre cianobactérias e a estrutura da comunidade bacteriana associada	66
3.3.3	Alterações na multiplicação celular dos isolados de <i>M aeruginosa</i> e sob diferentes condições de cultivo	67
3.3.4	Valores de alfa diversidade das comunidades bacterianas associadas a <i>M. aeruginosa</i> ao longo de seu desenvolvimento e sob distintas condições de cultivo ..	70
3.4	Discussão	80
3.4.1	Relação entre a filogenia das cianobactérias e composição e estrutura das comunidades bacterianas associadas.....	80
3.4.2	Alteração da estrutura e composição da comunidade bacteriana ao longo das fases de crescimento da cianobactéria	83
3.4.3	Alteração da estrutura e composição da comunidade bacteriana associada a cianobactérias quando esta é submetida a condições abióticas distintas	85
	Referências	88
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93

RESUMO

O genótipo do hospedeiro e as condições ambientais como moduladores da comunidade bacteriana associada

Sabe-se que humanos, plantas e animais são colonizados por uma elevada diversidade de microrganismos e que esses organismos eucariotos dependem destes microrganismos para manutenção do seu desenvolvimento. Usando dois modelos de associação microrganismo-hospedeiro, foi testado a hipótese de que hospedeiros pertencentes a domínios da vida distintos, apesar de suas particularidades estruturais, genóticas, filogenéticas e fisiológicas, compartilham similaridades nos modos de associação com a comunidade bacteriana. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi mapear a comunidade bacteriana associada a plantas do gênero *Anthurium* endêmicas e/ou não. Paralelamente, mapear a comunidade bacteriana associada a gêneros distintos de cianobactérias, ao longo da curva de crescimento e quando esta é submetida a condições de cultivo distintas. Como resultados, primeiramente, foi observado que plantas *Anthurium alcatrazense* endêmicas da Ilha apresentam riqueza e diversidade menor que as plantas da espécie *Anthurium loefgrenii* coletada na ilha de Alcatrazes e também menor que as plantas *Anthurium intermedium* e *Anthurium pentaphyllum* coletadas na região de continente. Também foi observado que a estrutura da comunidade bacteriana associada as plantas de *A. alcatrazense* é distinta quando comparada com as plantas coletadas no continente e também da própria ilha de Alcatrazes. Essa dissimilaridade foi principalmente representada por OTUs afiliadas à Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria. Esses resultados sugerem especificidade microrganismo-hospedeiro. Considerando a associação cianobactéria e bactérias heterotróficas, os resultados demonstraram que a comunidade bacteriana associada é específica de acordo com o gênero de cianobactéria, composta principalmente por classes apresentando abundância relativa de sequências distintas como, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria e Cytophagia. Por outro lado, foi possível observar que ao longo das fases de multiplicação da linhagem *Microcystis aeruginosa*, ocorre uma sucessão de grupos bacterianos, sendo principalmente representado pela variação da abundância de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Flavobacteria relativo a fase estacionária de multiplicação. Quando submetida em condições de cultivo distintas, foi possível observar que variações nas taxas de multiplicação da cianobactéria influenciaram uma modulação da estrutura da comunidade bacteriana associada, desta forma sugerindo que rápidas alterações na estrutura da comunidade bacteriana associada a *M. aeruginosa*, é resultado de processos de auto-regulação entre cianobactéria e bactérias heterotróficas associadas. De forma geral, pode-se sugerir que hospedeiros distintos apresentam padrões de associações com as bactérias similares, podendo estas similaridades sugerir estratégias para um melhor entendimento e manejo dos ecossistemas.

Palavras-chave: Padrões de associação; Microrganismo-hospedeiros; *Anthurium alcatrazense*; Cianobactérias; Comunidade bacteriana.

ABSTRACT

The host genotype and environmental conditions as modulators of the associated bacterial community

It is known that humans, plants and animals are colonized by a high diversity of microorganisms and that these eukaryotic organisms depend on these microorganisms to maintain their development. Using two microorganism-host association models, we hypothesized that hosts belonging to distinct domains of life, despite their structural, genotypic, phylogenetic and physiological particularities, share similarities in the modes of association with the bacterial community. Thus, the objective of this work was to map the bacterial community associated with plants of the genus *Anthurium* endemic and / or not. In parallel, map the bacterial community associated with distinct genera of cyanobacteria, along the growth curve of and when it is submitted to different culture conditions. In this context, we observed that *Anthurium alcatrazense* plants endemic to the Island, present less richness and diversity than the plants of the species *Anthurium loefgrenii* collected in the island of Alcatrazes and smaller than the plants *Anthurium intermedium* and *Anthurium pentaphyllum* collected in the continent. We found that the structure of the bacterial community associated with the plants of *A. alcatrazense* is distinct when compared to the plants collected in the continent and island of Alcatrazes itself. This dissimilarity was mainly represented by OTUs affiliated with Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria. These results suggest microorganism-host specificity. Considering the association cyanobacteria and heterotrophic bacteria, the results demonstrated that the associated bacterial community is specific according to the genus of cyanobacteria, composed mainly by abundance distinct from those of classes, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria and Cytophagia. On the other hand, it was possible to observe that during the multiplication stages of the *Microcystis aeruginosa* strain, a succession of bacterial groups occurs, mainly represented by the variation of the abundance of Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Flavobacteria relative to the stationary phase of multiplication. When submitted under different culture conditions, it was possible to observe that variations in cyanobacteria multiplication rates influenced a modulation of the associated bacterial community structure, thus suggesting that rapid changes in the bacterial community structure associated with *M. aeruginosa* is a result of processes of self-regulation between cyanobacteria and associated heterotrophic bacteria. In general, distinct hosts show patterns of associations with similar bacteria, and these similarities may suggest strategies for a better understanding and management of ecosystems.

Keywords: Association patterns; Microorganism-hosts; *A. alcatrazense*; Cyanobacteria; Bacterial community

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, a associação entre microrganismos e hospedeiros ocorre de forma ubíqua, em que todos os organismos envolvidos (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukaria*) (Torsvik et al., 2002; Roesch et al., 2007; Pisa et al., 2011) desenvolveram estratégias de associação simbiótica para sobreviver as condições bióticas e abióticas que limitam o desenvolvimento das comunidades e populações (Andrade et al., 1997; Arthussou et al., 2006; Hess et al., 2011; Mirazhi et al., 2012). O termo simbiose foi inicialmente descrito por Anton deBary, (1879) como uma íntima associação entre organismos distintos que vivem juntos, normalmente para o benefício de ambos ou no mínimo benefício de apenas um parceiro. Essas associações simbióticas podem ser categorizadas como comensalismo, parasitismo e mutualismo e podem ser variáveis de acordo com processos evolucionários, como mudanças ambientais, mudanças genéticas e/ou mudanças na saúde da associação microrganismos/hospedeiro (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Isso inclui casos de microrganismos comensais que normalmente, estão presentes em condições naturais no microbioma, sem apresentar ação patogênica, mas devido a variações nas condições hormonais e/ou metabólicas que afetam a disponibilidade de nutrientes, estes mudam de hábito e tornam-se patogênicos (Horn et al., 2004; Serbus et al., 2008). Goodson et al., (2009), demonstrou que a presença de uma baixa abundância de patógenos na cavidade bucal, pode servir como fonte de infecção se o hospedeiro enfrentar disfunções hormonais ou metabólicas que levem a alteração do equilíbrio microbiano “disbiose”, aumentando o risco doenças bucais. Por outro ponto de vista, Mendes et al., (2011) demonstrou que variações na abundância relativa de Proteobacteria e Actinobacteria estão ligadas a maior ocorrência e severidade de patógenos de plantas (Mendes et al., 2011).

Em sua definição original de simbiose, deBary também envolveu no conceito do termo simbionte, microrganismos patógenos/parasitas e mutualistas. Historicamente, o parasitismo e a patogenicidade microbiana tem sido foco primordial em pesquisas envolvendo interações microbianas, principalmente devido ao elevado impacto que os patógenos tem na saúde humana e os efeitos negativos que eles têm na agricultura e na ciência animal. Todavia os estudos recentes mantêm como foco o emprego do

termo simbiote como descrição para uma associação específica, estável e benéfica a ambos parceiros (Chaparro et al., 2012; Mondo et al., 2012; Hillsland et al., 2014). O mutualismo como uma relação benéfica para ambas espécies caracterizadas com relações de sintrofia uma relação onde ocorre uma complementação metabólica entre ambos organismos, como exemplo, microrganismos degradam materiais mais complexos, a fim de que outros degradem os mais simples, sinergismo é uma cooperação entre ambos para a degradação de algum composto e simbiose é uma relação de dependência entre parceiros onde ocorre a troca mútua de benefícios (van Elsas et al., 2006).

O mutualismo é uma relação ecológica (+/+), na qual ambos microrganismos e hospedeiros são beneficiados. Por exemplo, estudos utilizando seres humanos e animais como modelo de hospedeiros descrevem uma elevada dependência com a comunidade microbiana, pois estes últimos estão relacionados a funções essenciais no controle de doenças, nutrição, crescimento e desenvolvimento dos hospedeiros. Nestes casos, os perfis de grupos microbianos são específicos de acordo com parâmetros genéticos, metabólicos e características bióticas e abióticas do ecossistema em que se inserem (Gill et al., 2006). Estudos recentes demonstram que mamíferos com taxas variáveis de Firmicutes/ Bacteroidetes no intestino possuem menor capacidade de absorver energia e acumular gordura aumentando sua predisposição a obesidade (Turnbaugh et al., 2006).

Por outro lado, e semelhantemente, as plantas são colonizadas por microrganismos epifíticos que se encontram na superfície, como também os endofíticos que colonizam seus tecidos internos (Chaparro et al., 2014). Esses microrganismos são descritos por ter um papel crucial no desenvolvimento das plantas, normalmente desempenhando funções relacionadas a disponibilização de nutrientes, produzindo hormônios estimuladores do crescimento vegetal como proteção contra patógenos.

A associação entre plantas e microrganismos é uma das mais estudadas (Andreote et al., 2014) devido a sua importância tanto na área de conservação de espécies vegetais, como na agricultura (Andreote & Pereira e Silva, 2017). Teorias ecológicas recentes descrevem que o conceito de plantas como organismos livre de

microrganismos é obsoleto (Vandenkoornhuyse et al., 2015) e sabe-se que as plantas são colonizadas por uma alta diversidade de microrganismos, principalmente bactérias (Mendes et al., 2013). As plantas estabelecem estas interações como forma de se adaptarem as condições adversas e limitantes dos ambientes. Para tanto, a planta fornece compostos de carbono importantes para multiplicação das bactérias e estas, desempenham funções essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (Azevedo et al., 2000; Lareen et al., 2016), como aquisição de nutrientes, tolerância à estresses bióticos e abióticos (Hardoim et al., 2008) e proteção contra patógenos (Berg et al., 2015) e por fim essa composição de comunidade bacteriana associada é variável de acordo com as espécies das plantas (Turner et al., 2013), genótipo (Kuklinsky et al., 2004), estágio de desenvolvimento (Chaparro et al., 2014) e tecidos analisados (Esposito-Polesi et al., 2015).

Salimpour et al., (2010) demonstrou que o uso de inoculante com *Thiobacillus sp.* favorece a maior absorção de fósforo pela planta. Neste mesmo caso, Montañez et al., (2012) demonstrou a inoculação de 10 linhagens de bactérias diazotróficas no milho promove o crescimento das raízes, e isto possui potencial relação com as características de fixação de nitrogênio, produção de fitormônios (AIA) e solubilização de fosfato observadas *in vitro*. Também outros autores demonstraram que variações na abundância relativa de Proteobacteria e Actinobacteria está diretamente relacionado a proteção das plantas contra infecções de fungos patogênicos (Mendes et al., 2011). Neste mesmo sentido Costa et al, 2014 demonstrou que a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar é diferente de acordo com a variedade, e esses microrganismos específicos são importantes para funções de complementação do metabolismo da planta. Neste mesmo contexto, Esposito-Polesi et al (2015), demonstrou que os tecidos de plantas da mesma espécie hospedam estruturas de comunidades distintas, e que ao longo do tempo de rejuvenescimento de plantas micropropagadas, existe uma variação da comunidade bacteriana, significando maior especificidade na interação quando ela atinge o estágio final de desenvolvimento para serem levadas a campo.

Avanços recentes no campo do sequenciamento em larga escala, metagenômica e metabolômica e bioinformática, demonstraram haver muitas similaridades entre os fatores que determinam a composição da comunidade

bacteriana associadas a hospedeiros distintos (Turnbaugh et al., 2006; Gill et al., 2006, Mendes et al., 2011; Mendes et al., 2013). Alguns autores explicam que plantas, animais e seres humanos são sistemas abertos, os quais possuem várias áreas e nichos disponíveis possibilitando a colonização e estabilização de comunidades microbianas e sendo assim, caracterizados como ecossistemas abundantes. Apesar das diferenças na composição dos microbiomas oriunda de especificidade genética e metabólica, estes dois ecossistemas compartilham modos de associação similares com essas comunidades microbianas. Em que as comunidades microbianas são determinadas pelas características genotípicas, metabólicas e ambientais dos hospedeiros. Então, recentemente, estas similaridades entre os padrões de associação culminaram na teoria do holobiontes de animais e plantas (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, (2008), categorizam plantas e animais e seus microbioma como uma unidade de seleção natural, apresentando modos de associação semelhantes. Deste modo, traçando um paralelo entre filogenia e função do microbioma associado, resultando no melhor entendimento de processos ecológicos para manutenção da vida dos hospedeiros (Ramírez-Puebla et al., 2013).

Desta forma torna-se importante o uso desses organismos-modelos de associação como parâmetros para abordagem de outros níveis de classificação dos organismos. Para alguns autores, explorar os padrões de associação (baseados em taxonomia ou funcionalidade) entre bactérias e hospedeiros de domínios distintos, nos levará a uma melhor compreensão dos mecanismos e conceitos envolvidos na composição das comunidades bacterianas. Assim sendo, esta pode ser uma estratégia para identificar processos envolvidos na ocorrência destas interações, auxiliando no entendimento do estabelecimento das interações e no manejo de ecossistemas (Ramírez-Puebla et al., 2013; Nemergut et al., 2013; Mendes et al., 2015; Faust et al., 2015).

Sendo assim, comparativamente, mas em outro nível de classificação das relações ecológicas, um outro modelo de associação recentemente explorado se dá entre distintos microrganismos, por exemplo, na associação entre cianobactérias e bactérias heterotróficas (Bagatini et al., 2014). Esta associação é pouco conhecida, contudo de extrema importância para a biotecnologia, saúde humana e animal. Na área de biotecnologia, a associação cianobactérias e bactérias heterotróficas é

importante porque possui o papel de biorremediação de ambientes contaminados principalmente por hidrocarbonetos (Abed, 2005; Abed et al., 2009). Na área da saúde, muitos trabalhos buscam entender essa associação como uma forma de controlar a multiplicação celular das cianobactérias, e consequentemente a produção de toxinas. Há também a descrição de que algumas bactérias heterotróficas que utilizam as moléculas das toxinas para obtenção de energia (Maryuama et al., 2003). Desta forma, torna-se importante uma completa descrição da associação entre esses microrganismos.

Similarmente as plantas, estudos recentes descreveram que as cianobactérias como hospedeiros selecionam microrganismos do meio ambiente (Parveen et al., 2013; Secker et al., 2016) e necessitam dessa comunidade bacteriana associada como forma de sobreviver as condições bióticas e abióticas desvantajosas (Dziallas et al 2011). A composição da comunidade bacteriana associada à cianobactéria é variável de acordo com sua espécie (Louati et al., 2015), genótipo e condições ambientais (Eiler et al., 2004).

Sendo assim, nosso trabalho se objetivo em compreender as similaridades nos modos de associação entre essas modelos plantas– bactérias, e cianobactéria-bactéria heterotrófica como forma de compreender inter-relações específicas ocorrida nas associações entre a comunidade bacteriana e hospedeiros de domínios da vida distintos, *Eukaria* e *Bacteria*. Na primeira parte, nós avaliamos a associação entre plantas endêmicas e bactérias, assumindo que as características de especiação das plantas e seu genótipo é um fator primordial para a composição da comunidade bacteriana associada. Na segunda parte, nós buscamos entender como a comunidade bacteriana está associada a gêneros distintos de cianobactérias e como esta comunidade se comporta ao longo do crescimento da cianobactéria e ainda, o que ocorre com a estrutura e composição da comunidade quando o hospedeiro é submetido a condições de cultivo distintas.

Este trabalho tem como hipótese que hospedeiros distintos, apesar das suas particularidades estruturais, genotípicas, filogenéticas e fisiológicas, compartilham similaridades no modo de associação com a comunidade bacteriana. Para isso, nós mapeamos a comunidade bacteriana de plantas endêmicas (*Anthurium alcatrazense*)

da ilha de Alcatrazes São Paulo - Brasil e plantas do mesmo gênero de ocorrência na própria ilha de Alcatrazes e no continente, por meio do sequenciamento em larga escala do gene 16S RNA. Paralelamente, nós mapeamos a comunidade bacteriana associada a gêneros distintos de cianobactérias, a variação da comunidade ao longo da multiplicação da cianobactéria e quando esta é submetida a condições de cultivo distintas.

Referências

Abed R, Köster J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International biodeterioration & biodegradation*, 55: 29–37.

Abed, RMM, Dobretsov S, Sudesh K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied microbiology*, v. 106, 1:1–12.

Andreote FD et al., (2006); Model plants for studying the interaction of *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 419–426.

Andreote FD and Silva MCP. (2017) Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. *Current Opinion in Microbiology*. 37:29-34

Andreote FD, Gumiére T, Durrer A. (2014). Exploring the interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*. 71 (6): 528-539.

Arthursson V, Finlay RD, Jansson JK. (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. 8:1-10.

Azevedo JL, Maccheroni MJr, Pereira JO, Araújo WL. (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron J Biotechnol*. [WWW document] URL <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>

Bagatini IL, Eiler A, Bertilsson S, Klaveness D, Tessaroli LP, Vieira AAH. (2014). Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with Bloom-forming freshwater phytoplankton. *PloS one*, 9(1): e85950.

Berg G, Krause R, Mendes R. (2015). Cross-Kingdom similarities in microbiome ecology and biocontrol of pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 6:1311

Bouffaud ML, Poirer MA, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2014) Root microbiome relates to plant host evolution. *Environmental Microbiology*, 16, 2804-2814

Chaparro JM, Badri DV, and Vivanco JM: Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J*. 2014, 8:790-803.

De Bary. (1879). *Die erscheinung der Symbiose*. Strassburg Verlag Trubner.

- Dziallas C, Grossart H P. (2011). Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterial *Microcystis* sp.; Environment Microbiology. 13: 1632-1641.
- Eiler A, Bertilsson S. (2004). Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. Environment Microbiology. 6(12):1228-1243.
- Esposito-Polesi NP, Andrade PAM, Almeida CV, Andreote FD, Almeida M. (2015) Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. World Journal of Microbiology and Biotechnology. doi 10.1007/s11274-015-1924-0.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 312: 1355-1359.
- Goodson JM, Groopo D, Halem S, Carpino E. (2009). Is Obesity an Oral Bacterial Disease? Journal of Dentistry Research. 88(6): 519-523.
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. The ISME Journal. 2: 1221-1230
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas, JD, (2008). Properties of bacterial endo- phytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology 16: 463 – 471
- Hess, M, Sczyrba, A, Egan, R et al. (2011). Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. Science. 331: 463–467.
- Khoruts A, Dicksved J, Jansson JK, Sadowsky MJ. (2010). Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental microbiology, 6(12): 1244–51
- Lareen A, Burton F, Schäfer P. (2016) Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. Plant Molecular Biology. 90: 575-587.
- Ley R, Turnbaugh, P, Klein, S, Gordon, J. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity 444: 1022-1023
- Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, et al. (2012) Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. PLoS ONE 7(6): e37919. doi:10.1371/journal.pone.0037919
- Louati I, Pascault N, Debroas D, Bernard C, Humbert J F, and Leloup J. (2015). Structural diversity of bacterial communities associated with bloom- forming freshwater cyanobacteria differ according to the cyanobacterial genus. PLoS ONE. 10(11): e0140614. doi:10.1371/journal.pone.0140614
- Maruayama T, Kato K, Yokoyama A, Tanaka T, Hiraish. A, Park, HD. (2003); Dynamics of Microcystin- Degrading bacteria in Mucilage of *Microcystis*. Microbial Ecology. 46: 279-288.
- Mendes R and Raaijmakers JM. (2015). Cross-Kingdom similarities in microbiome functions. The ISME Journal. 1-3

Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, and Humbert JF. (2013). Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environmental Microbiology*. 5: 716–24.

Pisa G, Magnani GS, Weber H, Souza EM, Faoro H, et al. (2011). Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44(12): 1215–1221.

Ramírez-Puebla ST, Servin-Garcidueñas LE, Jiménez-Marín B, Bolaños LM, Rosenblueth M, Martínez J et al. (2013) Gut and root microbiota commonalities. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 2-9.

Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, et al. (2007). Pyrosequence enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*. 1: 283-290.

Sánchez O, Diestra, E, Esteve I and Mas, J. (2005) Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microbiological Ecology*. 50: 580–588

Secker NH, Chua JPS, McNoe L, Laurie RE, Guy PL, Orlovich A. Summerfield TC. (2016). Characterization of the cyanobacteria and associated bacterial community from an ephemeral wetland in New Zealand. 52: 761-773.

Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, Heavens D, Alston M, Swarbreck D, Osbourn A, Grant A, and Poole PS: Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*. 2013, 7:2248-2258.

van Elsas JD, Tam L, Finlay RD, Killham K, Trevors JT. (2006); Microbial interactions in soil. In: Van Elsas, J.D.; Jansson JK, Trevors JT. *Modern soil microbiology*. 2nded. New York: CRC press. p 177-204.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Defresne A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.13312

Zilber-Rosenberg I and Rosenberg E. (2008); Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenomic theory of evolution. *FEMS Microbiology reviews*. 32: 723-735.

2 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM PLANTAS ENDÊMICAS E NÃO ENDÊMICAS DO GÊNERO *ANTHURIUM* spp.

Resumo

As plantas hospedam uma elevada diversidade de microrganismos, os quais são selecionados para desenvolverem uma interação mutualística com base nas características genótípicas, por conseguinte funcionais de ambos. Sabe-se que plantas de ocorrência restrita possuem uma composição bacteriana particular, determinada por seu isolamento geográfico e possivelmente associada a diferenciação da comunidade bacteriana ao longo do processo de especiação vegetal. O objetivo deste trabalho foi mapear a comunidade bacteriana associada as folhas de plantas do gênero *Anthurium*. O estudo foi baseado em 21 plantas distribuídas na ilha de Alcatrazes e no continente (Costão rochoso, Intermédio e Mata). Nesses ambientes, foram coletadas quatro espécies: *Anthurium alcatrazense* (endêmica da ilha de Alcatrazes), *Anthurium loefgrenii* (ilha de Alcatrazes), *Anthurium penthaphyllum* (continente) e *Anthurium intermedium* (continente). Folhas destas plantas foram utilizadas para a extração do DNA, e posteriormente para o sequenciamento massivo do gene 16S rRNA bacteriano. Os resultados demonstraram que as plantas de *A. alcatrazense* possuem riqueza e diversidade menor do que as outras espécies do mesmo gênero, estando ou não estas localizadas na ilha de Alcatrazes. A planta de *A. alcatrazense* mostrou hospedar uma estrutura de comunidade particular, caracterizada por uma maior abundância relativa de Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria, enquanto que nas demais espécies foram observadas maiores frequências de sequências afiliadas a classe Alphaproteobacteria. Em conjunto, estes resultados sugerem que plantas endêmicas podem hospedar comunidades microbianas específicas.

Palavras chave: *A. alcatrazense*; Associação Planta-bactéria; Gene 16S rRNA; Sequenciamento Ion Torrent

Abstract

Plants host a high diversity of microorganisms, which are selected to develop an interaction of mutualism and / or symbiosis based on the functional and genotypic characteristics of both. It is known that plants of restricted occurrence have a particular bacterial composition, determined by their geographic isolation and possibly associated to the differentiation of the bacterial community throughout the process of plant speciation. The objective of this work was to map the bacterial community associated with *Anthurium* plant leaves. The study was based on 21 plants distributed in the island of Alcatrazes and in the mainland (Rocky Coast, Intermediate and Forest). In these environments, four species were collected: *A. alcatrazense* (endemic to the island of Alcatrazes), *Anthurium loefgrenii* (island of Alcatrazes), *A. penthaphyllum* (continent) and *A. intermedium* (mainland). Leaves of these plants were used for DNA extraction, and later for the massive sequencing of the bacterial 16S rRNA gene. The

results showed that the plants of *A. alcatrazense* have less richness and diversity than the other species of the same genus, whether or not these are located on the island of Alcatrazes. The plant of *A. alcatrazense* showed to host a particular community structure, characterized by a greater relative abundance of Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria, whereas in the other species frequencies of affiliated sequences the class Alphaproteobacteria. Taken together, these results suggest that endemic plants may also host specific microbial communities.

Keywords: *A. alcatrazense*; Bacteria profile; Plant-bacteria association; 16S rRNA gene; Ion Torrent sequencing

2.1 Introdução

Os microrganismos podem colonizar diferentes partes das plantas, estabelecendo interações simbióticas e mutualísticas (Kuklinsky et al 2004). Comunidades microbianas possuem papel fundamental na associação com plantas, pois estão envolvidas em funções essenciais, como nutrição, controle de patógenos e resistência a variações de fatores bióticos ou abióticos (Mendes et al., 2007; Dias et al., 2009).

O conjunto de microrganismos e seu material genômico, associados à uma planta recebe o nome de microbioma (Mendes et al., 2013). Este microbioma é caracterizado por alta diversidade, tanto compondo os grupos de microrganismos encontrados fora como dentro dos tecidos vegetais (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Esta diversidade está comumente associada a deposição de diversas formas de carbono que derivam do material assimilado pelas plantas por fotossíntese (Bisseling et al., 2009). Essa disponibilidade de nutrientes é fortemente relacionada com as características genotípicas de cada planta, o que resulta numa modulação diferencial da composição e da estrutura da comunidade bacteriana associada a cada espécie vegetal (Eilers et al., 2010). Nos últimos anos, a microbiota das plantas tem sido alvo de pesquisas que atribuem aos microrganismos o papel de reservatório de funções essenciais para sobrevivência das plantas frente a condições adversas (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Kier et al., 2011; Bulgarelli et al., 2013; Werner et al., 2014; Vandenkoornhuyse et al., 2015). Na agricultura, essas funções têm sido exploradas biotecnologicamente para aumentar a sustentabilidade de sistemas agrícolas (Mendes et al., 2007). Em um panorama ambiental, características

microbianas importantes têm sido descritas em microrganismos associados as plantas, sendo estas relacionadas a manutenção de espécies em ambientes restritos e preservados (Golinska et al., 2015).

Plantas pouco estudadas e de ocorrência restrita, como as endêmicas, são alvos para a bioprospecção de novos produtos (Debnath et al., 2016). Neste tipo de exploração, sugere-se que o processo evolutivo ocorrido entre as espécies (plantas e bactérias) foram primordiais para determinar uma forte e restrita associação entre os organismos e a sobrevivência de ambos em ambientes com condições bióticas e abióticas variáveis (Hardoim et al., 2008) e, no entanto, produção de compostos específicos e pouco explorados. Muitos estudos têm sido realizados no intuito de se obter um completo entendimento da biologia associativa entre plantas e microrganismos, incluindo descrições taxonômicas e funcionais (Phillippot et al., 2013; Shi et al., 2014). Por exemplo, Debnath e colaboradores (2016) descreveram microrganismos específicos hospedados na planta medicinal *Rhododendron arboreum*, endêmica de regiões de elevadas altitudes no sudeste dos alpes Himalaios (Tawang/China). Esses autores buscaram compreender a associação entre plantas e a diversidade de microrganismos, e os processos que determinavam a ocorrência de uma comunidade específica nestas plantas. Um outro estudo mapeou a distribuição e a diversidade de fungos associados à oito macroalgas endêmicas das regiões geladas da Antártida, descrevendo nestes fungos um grande potencial biotecnológico (Godinho et al., 2013).

Desta forma, o presente trabalho se baseia na hipótese de que a planta *Anthurium alcatrazense*, endêmica da Ilha de Alcatrazes/ São Paulo, hospeda uma comunidade bacteriana particular, distinta de outras plantas do gênero *Anthurium*, encontradas tanto na própria ilha de Alcatrazes, como também no continente. Levando em consideração o exposto e face a relevância do tema, este trabalho tem como objetivo mapear a comunidade bacteriana associada a plantas endêmicas e não endêmicas do gênero *Anthurium*, presentes em diferentes ambientes da ilha de Alcatrazes e plantas do continente, coletadas em três ambientes distintos (Costão rochoso, intermédio e Mata).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Locais de amostragem

As amostragens em ambientes de ilha e em regiões de continente foram realizadas na época de inverno e verão, especificamente nas datas 16/06/2014 e 10/02/2015, respectivamente. Essas amostragens ocorreram na ilha de Alcatrazes - São Paulo, Brasil e na região de Ubatuba, distantes 97 quilômetros uma da outra. No continente as coletas foram distribuídas em 3 ambientes distintos, de acordo com a proximidade do mar. Foram amostradas plantas na região de Costão rochoso, cerca de 6 metros distante do mar ($S\ 23^{\circ}27'34,43''$; $W\ 45^{\circ}01'11,40''$); ambiente de Intermédio, distante cerca de 600 metros do mar ($S\ 23^{\circ}27'35,4''$; $W\ 45^{\circ}02'18,6''$); e um ambiente de Mata (Mata Atlântica), distante 6 km do mar ($S\ 23^{\circ}27'34,63''$; $W\ 45^{\circ}01'11,32''$) (Figura 2.1). Todas as amostragens obtiveram permissão de coleta de espécimes em ambiente natural sob o número do CIsbio (37256-4)

Figura 2.1-Visualização e localização das plantas do gênero *Anthurium* amostradas para o presente estudo. (A) *A. alcatrazense*, planta endêmica de ocorrência restrita a ilha de Alcatrazes. (B) *A. loefgrenii*, planta não endêmica coletada na ilha de Alcatrazes. (C) Locais de Amostragem, identificados como, P1- Ilha de Alcatrazes, P2- Costão rochoso (Continente), P3- Ambiente de intermédio (Continente), P4- Mata. (D) *A. pentaphyllum*, espécie coletada no continente, nos ambientes de Costão Rochoso e Mata. (E) *A. intermedium*, coletados no Costão rochoso, intermédio e Mata. Em cada ponto foram amostradas três plantas do gênero *Anthurium*. Esses pontos estão localizados na região de São Sebastião/São Paulo (P1) e Ubatuba/São Paulo (P2, P3, P4). A amostragem no continente foi realizada na região de Ubatuba/São Paulo (Costão Rochoso - S23° 27'34.43" /W45°01'11.40", Mata- S 23°28'18,5"/W45°02'18,6") e a coleta na ilha foi realizada na ilha de Alcatrazes (S24°05' 55.60" /W45°37' 10.31"), localizada a 35 km da região de São Sebastião-São Paulo e 97 km da região dos pontos (P2, P3, P4).

2.2.2 Material coletado

No total, foram coletadas vinte e uma amostras de plantas do gênero *Anthurium*, pertencentes a 4 espécies distintas e distribuídas dentre os 4 pontos de amostragem supracitados.

O gênero *Anthurium* possui características bastante marcantes. São plantas herbáceas epífitas, semi-epífitas, rupícolas ou terrestre. Possuem lâmina foliar oblonga, lanceolada, obvoada ou digitada, com ápice agudo, acuminado a mucronado, base cuneada, obtusa a truncada, margem inteira, venação peniparalelínea, nervuras medianas achatadas impressas e proeminentes e/ou aguda à obtusa, dispostas adaxialmente proeminente e arredondadas e carenadas abaxialmente. Possuem de 10 a 19 pares de nervuras secundárias coletoras saindo da base da lâmina ou um pouco acima. Inflorescência sempre um por simpódio, pedúnculo ereto e/ ou pedúnculo cilíndrico (Temponi & Nadruz-Coelho, 2011).

A partir destas características principais do gênero, 4 espécies foram observadas e amostradas: *A. alcatrazense*, *A. loefgrenii*, *A. penthaphyllum* e *A. intermedium*. Duas espécies foram coletadas na ilha de Alcatrazes, duas espécies no Costão rochoso, uma espécie no ambiente de Intermédio, e duas espécies na Mata.

A espécie *A. Alcatrazense*, descrita por Nadruz-Coelho e Catharino (2008), é endêmica da ilha de Alcatrazes, possui caule e entrenós curtos, pecíolo esverdeado, roliço, abaxialmente, 5,1- 27 X 0,2 – 0,5 cm. Genículo curto e intumescido, mais claro que o pecíolo 3-9 X 4-7 mm Folhas pequenas, lâmina foliar cartácea, lanceolada, com base aguda. Nervura primária arredondada em ambas as faces à subaguda adaxialmente; nervuras secundárias numerosas (7-20), pouco visíveis em ambas as faces. A espécie possui grande plasticidade, expressa por populações tipicamente heliófilas, a pleno sol, sobre costões rochosos, geralmente em amplas touceiras de plantas “atarracadas”.

A espécie *A. loefgrenii*, também amostrada na ilha de Alcatrazes, não possui característica de endemismo pois já foram observados espécimes habitando regiões de mata Atlântica, no estado de São Paulo e Paraná (Temponi & Nadruz, 2011). Planta de hábito terrestre, possui caule e entrenós longos. Folhas simples, grandes; pecíolo

3,2 – 37,7 cm comprimento verde e de rara ocorrência verde-avermelhado; cilíndrico. Lâmina elíptica e lanceolada, 7-42,2 X 2,2-16,5 cm, ereta a patente em relação ao caule, ápice agudo, obtuso. Nervura secundárias impressas abaxialmente, evidentes a levemente proeminentes abaxialmente, 7-18 pares, nervuras coletoras inseridas na base foliar, 0,3 a 2 cm afastada da margem (Rocha et al., 2014).

A espécie *A. penthaphyllum*, amostradas no ambiente de Costão rochoso e Mata, é uma planta de hábito hemi-epífita e terrestre; caule e entrenós 0,4- 10,7 cm. Folhas compostas; pecíolo 21,4 – 65,5 cm, verdes, cilíndricos. Nervura principal reta, obtusa ou aguda. Nervuras secundárias impressas adaxialmente, proeminentes abaxialmente, 9-18 pares, nervura coletora na base do folíolo ou um pouco acima dela, 0,4-2,2 cm afastada da margem. Pedúnculo 1,8- 18,4 cm menos da metade do comprimento do pecíolo (Rocha et al., 2014).

A espécie *A. intermedium*, foram amostradas em ambiente de Costão rochoso e Mata. Planta de hábito terrestre, possui caule e entrenós longos. Folhas simples, grandes; pecíolo 2,4 – 15,3 cm comprimento verde e de rara ocorrência verde-avermelhado; cilíndrico. Lâmina elíptica e lanceolada, 3,2-15,3 X 1,1-5,2 cm, ereta em relação ao caule, ápice agudo, obtuso. Nervura principal aguda ou obtusa. Nervura secundárias, evidentes a levemente proeminentes abaxialmente, 8-13 pares, nervuras coletoras inseridas na base foliar, 0,2 a 0,7 cm afastada da margem (Rocha et al., 2014).

Na ilha de Alcatrazes foram coletadas folhas das espécies *A. alcatrazense* e *loefgrenii* e no continente, inicialmente foram coletadas folhas das espécies *A. intermedium* e *A. penthaphyllum* distribuídas em grandes populações no Costão rochoso. Posteriormente, foram coletadas folhas da espécie *A. intermedium* no ambiente de Intermédio entre o *Costão rochoso* e *Mata*. Por fim, foram coletadas folhas das espécies *A. intermedium* e *A. penthaphyllum* no ambiente de *Mata*. A amostragem foi realizada em triplicata, e em cada planta foram coletadas três folhas distintas (Tabela 2.1).

Espécimes de cada espécie foram coletadas e o material botânico foi herborizado e depositado no herbário HRCB (Herbário Rioclarense) do Instituto de Biociências (Unesp/ Rio Claro), acrônimo de acordo com o Index Herbarium – (Thiers,

2016), sob colaboração do Prof. Dr. Marco Antônio de Assis e Msc. Letícia Peres Poli, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. A identificação taxonômica foi realizada com base em literatura consultada (Coelho, Waechter e Mayo, 2009; Coelho, 2012; Mamede et al., 2012) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Descrição das características das amostras e identificação das plantas pertencentes ao gênero *Anthurium*.

Descrição Amostragem					Coordenadas geográficas		
Ident.	Gênero	Espécies	Herbário	L. de coleta	Latitude	Longitude	Referência
AA-AA	<i>Anthurium</i>	<i>A. alcatrazense</i>	HRBC 64645	Alcatrazes	S 24°05'56.01"	W45°41'32,34"	Nadruz e Catharino, 2008
AI-INT	<i>Anthurium</i>	<i>A. Intermedium</i>	HRBC 64635	Intermédio*	S 23° 27' 35,4"	W 45°02'18,6"	Valadares et al., 2010
AI-CST	<i>Anthurium</i>	<i>A. Intermedium</i>	HRBC 64637	Costão Rochoso	S 23°27'34.43"	W 45°01'11.40'	Valadares et al., 2010
AI-MT	<i>Anthurium</i>	<i>A. Intermedium</i>	HRBC 64636	Mata	S 23° 28' 18,5"	W 45°10'20,5"	Valadares et al., 2010
AL-AL	<i>Anthurium</i>	<i>A. loefgrenii</i>	HRBC 64647	Alcatrazes	S 24° 05' 55,7"	W 45°41'28,6"	Coelho et al., 2014
AP-CST	<i>Anthurium</i>	<i>A. penthaphyllum</i>	HRBC 64667	Costão Rochoso	S 23°27'34.63"	W45°01'11.32"	Almeida et al., 2005
AP-MT	<i>Anthurium</i>	<i>A. penthaphyllum</i>	HRBC 64669	Mata	S 23°27'34.63"	W 45°01'11.32'	Almeida et al., 2005

* Ct. Rochoso – Costão rochoso

** Ambiente intermediário entre Costão rochoso e Mata,

No laboratório, as folhas foram lavadas com água corrente para eliminar a maior parte das impurezas, e posteriormente submetidas ao protocolo de desinfecção superficial para eliminação da maior parte dos microrganismos epifíticos. Inicialmente, foram embebidas em álcool 70% por 1 minuto, posteriormente em hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos, álcool 70% por 1 minuto, e depois submetidas à 2 etapas de lavagem em água destilada previamente esterilizada. Amostras dessas duas etapas finais foram usadas como controle do processo de desinfecção superficial. Após a desinfecção superficial, as plantas foram trituradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de cadinhos e pistilos. O material resultante foi então armazenado em “ependorfs” de 1,5ml e mantidos em freezer -80°C, até o processamento da extração do DNA total

2.2.3 Extração do DNA total

Aproximadamente 100 mg do material vegetal foi triturado em nitrogênio líquido, e cada uma das amostras foi submetida a extração do DNA total utilizando o kit *Power Plant DNA Isolation* (MoBio Laboratories, Carlsbab, CA), seguindo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído, assim como sua quantificação, foi determinada por meio de eletroforese em gel de agarose à 1,0% (m/v), preparado em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5µl dos DNAs extraídos junto a 3µl de um tampão de corrida *Loading buffer 6x* (Azul de bromofenol 0,05% (p/v); Sacarose 40% (p/v); EDTA 0,1M (pH 8,0); SDS 0,025% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta (*DNr Bio-imaging Systems Minibis pro 16mm*). As quantidades de DNA extraídos das amostras variaram entre 5 e 10 ng.µl⁻¹ de DNA.

2.2.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA total via *Ion Torrent*.

A geração do fragmento a ser utilizado para o sequenciamento da região hipervariável V6 do gene 16S rRNA ocorreu em duas etapas. Primeiramente, as amostras do DNA extraído das folhas foram submetidas à amplificação utilizando os primers 799F (5' - AAC MGG ATT AGA TAC CCK G – 3') e 1492R (5' – TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT – 3') (Chelius & Triplett, 2001), os quais foram utilizados para evitar a amplificação do DNA Cloroplastidial. As condições de amplificação foram determinadas para reações de volume final de 50 µl, compostas por 1X Tampão de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 0,4 mM BSA, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil). A ciclagem de amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*, Waltham, USA), programado para fazer o seguinte processo térmico: 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos; e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose 1%, e submetidos à eletroforese. Foram geradas duas bandas, uma de

maior tamanho aproximadamente 1090pb, correspondente ao gene 16S rRNA mitocondrial das plantas; e uma de menor tamanho aproximadamente 735pb correspondente ao gene 16S rRNA bacteriano desejado.

A banda menor foi excisada do gel e purificada utilizando o *Kit Wizard® Genomic DNA purification* (Promega, USA). Após a purificação, estas amostras foram utilizadas como DNA molde em uma nova reação utilizando o conjunto *primers 967F* (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) (Sogin et al., 2006) e *1193R* (CGT CRT CCC CRC CTT CC) (Wang; Qian, 2009), os quais, geram fragmentos de aproximadamente 230pb. O *primer forward 967F* foi adicionado de sequências “*barcodes*” contendo um conjunto de 5 nucleotídeos, os quais foram sintetizados separadamente e utilizados como marcadores para cada uma das amostras (<http://vamps.mbl.edu/>).

As condições de amplificação foram determinadas para reações de volume final de 50 µl, compostas por 1X Tampão de PCR, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 0,02 U/µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) de acordo com (Kavamura et al, 2013). Após amplificação, todos fragmentos contendo os “*barcodes*” foram misturados em concentrações equimolares e purificados com o *kit Charge Switch PCR Clean-UP* (Invitrogen, Brasil). Posteriormente, foi realizada uma PCR de emulsão usando o *Ion OneTouch 2™* com o *Ion Template PGM™ OT2 400 Kit* (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. As bibliotecas de fragmentos do gene 16S rRNA foram sequenciadas utilizando um *Ion Chip 316™ Kit v2*, usando o sistema *Ion Torrent (Personal Genome Machine™)*.

Todos os procedimentos de preparação das bibliotecas, desde a PCR de emulsão até a obtenção do arquivo de sequências (. *fastq*), foram realizadas pela equipe do Doutor Itamar Soares de Melo, no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP).

2.2.5 Análise das sequências

As análises do arquivo (. *fastq*) contendo as sequências brutas foram realizadas utilizando o *software Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) versão 1.9 (Caporaso et al., 2010a). Inicialmente, as sequências foram separadas por amostra de acordo com “*barcode*” inserido na PCR. Posteriormente, as sequências foram

separadas dos *primers* e foram filtradas por qualidade (Qual.score = 25, tamanho dos barcodes = 5, número máximo de *primer mismatch* = 2 e uma janela de qualidade 50 e número máximo de homopolímeros = 6). Adicionalmente, sequências menores que 180pb foram descartadas.

As sequências válidas foram agrupadas em OTUs (*Operational Taxonomic Units*) à 97% de similaridade usando o método *Uclust* (Edgar, 2010), e alinhadas pelo método *PyNAST* (Caporaso et al., 2010). A afiliação taxonômica de cada sequência representativa das OTUs foi realizada por comparação com as sequências disponíveis no banco de dados *Greengenes* (DeSantis et al., 2006). Posteriormente, sequências quimeras foram removidas usando o método UCHIME (Edgar et al., 2011). OTUs de baixa abundância (ex., *singletons* e *doubletons*) foram removidas do conjunto de dados. No entanto, mesmo após todos esses procedimentos de curadoria das sequências, ainda restaram sequências da classe “*Chloroplast*”. O conjunto de dados foi então filtrado de todas as sequências referentes à classe “*Chloroplast*”, as quais não foram objeto de estudo. Após esses passos, foi realizada a normalização das amostras, utilizando o comando do *Qiime* “*single_rarefaction*”, o qual realiza uma re-amostragem dos dados, gerando um novo arquivo normalizado, onde todas as amostras são analisadas com o mesmo número de sequências. No final da análise foi gerada uma tabela *otu_table*, descrito por OTUs X amostras X taxonomia.

2.2.6 Análises estatísticas estrutura da comunidade bacteriana associada

A compreensão das mudanças na composição da comunidade bacteriana associadas as plantas coletadas foi obtida por meio do cálculo de alfa-diversidade e beta-diversidade das amostras. A alfa-diversidade compreende as características ecológicas de cada uma das amostras, enquanto a beta-diversidade faz uma análise comparativa da diversidade entre as amostras (Lozupone et al., 2007).

O cálculo da alfa-diversidade foi realizado utilizando o software *Qiime*, onde foram obtidos os índices de Riqueza de grupos (Chao1 - S'), Diversidade (Shannon – H') e índices de cobertura do sequenciamento *Good's Coverage*. Para entender a variação entre os valores obtidos, foi realizado um teste de análise de variâncias

(ANOVA) ($p < 0,05$), seguido do teste de comparação de médias de Tukey, considerando o valor de significância à 5%.

Para o cálculo da beta-diversidade foram geradas matrizes de distâncias baseadas no algoritmo de *Bray-Curtis* (Bray & Curtis, 1957), as quais sustentaram a análise de coordenadas principais (PCoA). Esta então, permitiu a observação da distribuição dos agrupamentos entre as amostras numa escala bidimensional. Ainda assim, foram empregadas análises de PERMANOVA e ANOSIM ($p < 0,05$), baseadas em 9.999 permutações randômicas da tabela de OTUs, para testar a significância dos agrupamentos encontrados na PCoA. Por fim, foi realizado um teste de dissimilaridade de agrupamentos (SIMPER), baseado no resultado da (PCoA), o qual teve como objetivo destacar as OTUs mais responsivas para a dissimilaridade entre os agrupamentos encontrados. Este teste foi desenvolvido utilizando o software PAST versão 2.17 (Hammer et al., 2001).

2.3 Resultados

2.3.1 Riqueza e diversidade da comunidade bacteriana associada as plantas do gênero *Anthurium*

A partir do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA foi obtido um total de 572.330 sequências válidas após processo de filtragem das mesmas por qualidade de *reads*. Depois da exclusão das sequências oriundas da classe “*Chloroplast*”, a *otu_table* foi normalizada em 1.085 sequências por amostra, as quais apresentaram índices de cobertura de sequenciamento *Good's Coverage* com valor médio de $0,83 \pm 0,15$.

Na análise de alfa-diversidade, apenas as plantas endêmicas *A. alcatrazense* (AA-AL) apresentaram índices estimativos de riqueza e diversidade de bactérias associadas, significativamente menores do que as demais plantas do gênero *Anthurium* ($S' = 160,22$; $H' = 3,83$) ($p < 0,05$). Adicionalmente, foi observado que as plantas coletadas no ambiente de intermédio e mata apresentaram valores maiores de riqueza e diversidade do que as demais plantas coletadas nos ambientes próximos ao mar (Figura 2.2A, B).

Figura 2.2- Riqueza e diversidade das comunidades bacterianas associadas as plantas de *Anthurium* coletadas em diferentes ambientes. (A) Índice de riqueza Chao1 (S), para as plantas do gênero *Anthurium*. (B) Índice de diversidade Shannon (H'), para as plantas do gênero *Anthurium*. A identificação dos tratamentos está descrita na tabela 2.1. Os valores derivam de uma análise de 1.085 sequências por amostra. As barras representam valores médios de três repetições biológicas (três plantas analisadas) e o desvio padrão da média (n = 3). As barras seguidas de mesma letra indicam ausência de significância, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey (p < 0,05).

2.3.2 Diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana nas diferentes espécies de *Anthurium spp.*

Por meio da análise beta-diversidade da estrutura da comunidade bacteriana, determinada pela análise de coordenadas principais (PCoA), foi possível realizar três observações importantes: *i*) a estrutura da comunidade bacteriana associada à planta de *A. alcatrazense* é significativamente distinta das plantas coletadas nos ambientes do Continente (Permanova: Pseudo-F = 3,059, p = 0,009; Anosim R = 0,70; p = 0,006); *ii*) a estrutura da comunidade bacteriana da planta endêmica *A. alcatrazense* é significativamente distinta das plantas *A. loefgrenii*, coletadas também na ilha de Alcatrazes) (Anosim R = 0,66; p = 0,001); *iii*) a estrutura da comunidade bacteriana associada à *A. loefgrenii* apresenta similaridade com as encontradas em plantas coletadas no Costão rochoso (Anosim R = 0,21; p = 0,001) (Figura 2.3)

Figura 2.3- Análise de coordenadas principais (PCoA) obtida para a estrutura da comunidade bacteriana associada às plantas do gênero *Anthurium*, representadas pela frequência de 500 OTUs e cada uma das plantas analisadas (1.085 sequências por amostra). Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância explicada pela soma dos dois principais eixos 28,1%.

2.3.3 Composição taxonômica da comunidade bacteriana associada as plantas de *Anthurium* spp.

A classificação taxonômica das OTUs bacterianas descritas como associadas as plantas do gênero *Anthurium* revelou a presença de 29 filos bacterianos compondo estas comunidades, sendo os mais abundantes Proteobacteria (55%), Actinobacteria (15%), Firmicutes (10%), Bacteroidetes (4,0%), Acidobacteria (3,2%), além de sequências não classificadas que contaram com (9%) da abundância relativa total de sequências (Figura 2.4A). A partir destes filos foram observadas 56 classes, sendo as

classes mais abundantes: Gammaproteobacteria (25%); Actinobacteria (18%); Alphaproteobacteria (13%); Betaproteobacteria (12%); Bacilli (6%); Clostridia (3%) e Deltaproteobacteria (2%); Bacteroidia (2%) e Acidobacteria (2%). As outras classes taxonômicas representaram por uma abundância geral menor que 2% (Figura 2.4B).

Destacadamente, as plantas de *A. alcatrazense* (AA-AL) possuíram uma maior abundância de Proteobacteria (85%) e menor abundância de Actinobacteria (5%) e Firmicutes (2%), estes grupos apresentaram ocorrência estatisticamente distinta, comparado as plantas de *A. loefgrenii* e as plantas coletadas no continente. Especificamente, estas últimas não apresentaram diferença estatística sob a ocorrência dos filos. Considerando a classificação ao nível de classe, foi possível observar que as frequências relativas de Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria foram de (44%) e (23%) e foram estatisticamente maiores nas plantas de *A. alcatrazense* ($p < 0,05$). As outras classes não apresentaram diferença estatística quando comparadas entre as plantas de *A. alcatrazense* e as outras plantas coletadas.

Figura 2.4- Classificação taxonômica das OTUs, descrevendo a abundância relativa dos filos (A) e classes (B) de bactérias associadas a plantas de diferentes espécies do gênero *Anthurium*, coletados em ambientes de ilha ou continente. As identificações dos tratamentos estão descritas na tabela 2.1. Os valores representam médias ($n = 3$).

2.3.4 Grupos bacterianos responsáveis pela diferenciação das comunidades bacterianas associadas à *Anthurium* spp.

Por meio do teste de Simper, baseado nas inferências da PCoA, foi possível descrever onze táxons bacterianos principais, o quais, contribuíram com 45% da dissimilaridade geral (em média) observada entre as plantas de *A. alcatrazense* das demais plantas do gênero *Anthurium*, ou comparando a comunidade de *A. alcatrazense* e *A. loefgrenii* (“*t*” Student; $p < 0,05$).

A partir disso, foi possível fazer duas inferências importantes: i) A afiliação taxonômica destas OTUs revelou a presença de cinco OTUs contribuindo com mais de 2%, (abundância relativa) para a dissimilaridade entre as plantas de *A. alcatrazense* e as plantas coletadas no Continente: denovo 13665 (Betaproteobacteria) (18,2% de contribuição a dissimilaridade), denovo 5450 (Gammaproteobacteria) (10,2%), denovo 8378 (Gammaproteobacteria) (6,2%), denovo 6870 (Alphaproteobacteria) (4,8%) e denovo 10827 (Gammaproteobacteria) (2,5%). Por meio do teste de comparação de médias, foi possível observar que apenas duas dessas OTUs, ocorreram diferencialmente ($p < 0,05$) nas plantas de *A. alcatrazense* e nas plantas coletadas no Continente, denovo 13665 (Betaproteobacteria) e denovo 5450 (Gammaproteobacteria) (Figura 2.5A) ii) A afiliação taxonômica das OTUs revelou a presença cinco OTUs contribuindo com mais de 2% para a dissimilaridade entre plantas de *A. alcatrazense* e *A. loefgrenii*: denovo 13665 (Betaproteobacteria) (19,2% de contribuição a dissimilaridade), denovo 6870 (Alphaproteobacteria) (6,1%), denovo 5450 (Gammaproteobacteria) (3,0%), denovo 8378 (Gammaproteobacteria) (2,2%), denovo 4168 (Gammaproteobacteria) (2,0%). Por meio do teste de comparação de médias, foi possível observar que quatro dessas OTUs, ocorreram diferencialmente ($p < 0,05$) nas plantas (Figura 2.5B).

Figura 2.5- Análise de contribuição de táxons à dissimilaridade das comunidades bacterianas associadas a espécie *A. alcatrazense* em comparação com as demais espécies coletadas no Continente e as plantas de *A. loefgrenii*, determinada pelo método de SIMPER. (A) as barras em vermelho revelam à abundância das OTUs das plantas *A. alcatrazense* (endêmica) e em azul a abundância média as outras plantas do gênero *Anthurium* coletadas no continente. (B) (A) as barras em vermelho revelam à abundância das OTUs das plantas *A. alcatrazense* (endêmica) e em azul a abundância média as plantas do gênero *A. loefgrenii* coletadas na ilha de Alcatrazes. O asterisco acima das barras indica a diferença estatística, de acordo com o teste de comparação de médias de ("t" Student; $p < 0,05$).

2.4 Discussão

Alguns autores, estudando a dinâmica evolutiva de espécies na ilha de Alcatrazes, descreveram que o isolamento geográfico ocorrido a cerca de 9 mil anos

(era do Pleistoceno) teve papel importante na especiação dos organismos que permaneceram na ilha, levando a alterações genotípicas e fenotípicas (Furtado et al., 1992; Marques et al., 2002b). Dentro desse panorama, Nadruz-Coelho & Catharino (2008) descreveram as plantas da espécie *A. alcatrazense* como exemplos deste processo. Estas plantas possuem características morfológicas peculiares, as quais diferenciam-nas de outras plantas de mesmo gênero, como tamanho da planta, hábito heliófilo e epífita. As espécies mais próximas a esta, encontrados em ambientes do continente, são plantas maiores, habitando ambientes sombreados e sobrevivendo sobre a serapilheira, características também observadas na própria ilha de Alcatrazes para a planta *A. loefgrenii* (Coelho et al., 2004; Almeida et al., 2005; Valadares et al., 2010; Rocha et al., 2014). Esse padrão de especiação tem sido observado também para outras espécies de plantas em Arquipélagos (Comes, Tribsch e Bittkau, 2008; Chase e Myers, 2011). Ainda assim, Marques et al. (2002b) descreveram um processo de especiação semelhante para outros organismos endêmicos da ilha de Alcatrazes, correlacionando o tamanho dos organismos com o tipo de nutrição na ilha

Neste mesmo contexto, Nadruz-Coelho & Catharino (2008) sugerem que a evolução geológica da ilha e as flutuações no nível do mar, gerou um cenário ideal para estudar os efeitos do isolamento geográfico na especiação alopátrica dirigida por deriva genética. Por exemplo, no caso de *A. alcatrazense*, pode-se sugerir que a limitação nutricional levou a geração de plantas menores, e a busca de uma maior obtenção de energia via processo de fotossíntese, encontrada pela colonização dos costões rochosos.

Estudos teóricos e empíricos abordando sistemas de dispersão de macrorganismos, sugerem que os mesmos processos e parâmetros de distribuição destes podem ser atribuídos à ocorrência de microrganismos associados a seus hospedeiros (Martiny et al., 2006; Lankau et al., 2012; Peralta et al., 2014). Este sistema assume que organismos com distribuição restrita, podem hospedar uma estrutura de comunidade bacteriana particular. Essas sugestões servem de base para dar suporte a nossa hipótese de que plantas endêmicas, restritas à determinados ambientes, hospedam uma estrutura e composição de comunidade bacteriana particular.

Estudos recentes descrevem que a comunidade bacteriana associada a plantas do gênero *Anthurium* apresentam uma redução na riqueza e diversidade, quando comparada com a rizosfera e o solo adjacente, sendo, portanto, ativo o processo exercido pela planta para selecionar microrganismos do ambiente adjacente para compor sua comunidade bacteriana, o que deve resultar em benefícios da saúde da planta (Sarria-Guzmán et al., 2016). Poucos e raros trabalhos foram publicados, descrevendo a comunidade microbiana associada a plantas do gênero *Anthurium*. Sendo assim, este último trabalho corrobora e serve de base para o nosso trabalho, sugerindo, portanto, que as plantas do gênero *Anthurium* selecionam microrganismos parceiros do ambiente, e existe uma especificidade e uma redução de grupos bacterianos quando avaliado a comunidade bacteriana de acordo com os tecidos das plantas desde a superfície das raízes até os tecidos mais internos da planta, e até as folhas. No presente trabalho foi observado que a estimativa da riqueza e da diversidade bacteriana associada às folhas das plantas endêmicas da espécie *A. alcatrazense*, foi significativamente menor que os valores encontrados para a folhas das plantas encontradas no Continente (Costão rochoso, Intermédio e Mata). Este fato também ocorreu ao compararmos os valores para a planta endêmica e a outra espécie do mesmo gênero que ocorre na ilha (*A. loefgrenii*).

Ao desenvolver o nosso trabalho e durante todas as buscas na literatura, não foram encontrados relatos sobre a distribuição da comunidade bacteriana associada à *A. alcatrazense* e *A. loefgrenii*. Essa falta de estudos comparativos, reforça o pioneirismo do presente trabalho.

Alguns autores nomeiam o processo de redução da diversidade bacteriana relacionado a processos evolutivo do hospedeiro endêmico de ilhas localizadas distantes do continente, como processo de deriva ecológica (Lankau et al., 2012). Neste processo grupos bacterianos de baixa abundância e não essenciais para manutenção das condições adaptativas do hospedeiro são extintos, levando a permanência de um menor número de simbioses ao longo do tempo (Ezenwa et al., 2012; Wong et al 2015; Adair et al., 2017). De fato, isso nos leva a acreditar que essa menor diversidade associada as plantas de *A. alcatrazense* seja resultado de uma íntima relação bactéria-planta ao longo do processo de especiação da planta. Esse processo de associação entre organismos endêmicos e comunidades microbianas, já

foi descrito para outras espécies de plantas (Prakamhang et al., 2009; Debnath et al., 2016).

É conhecido que a interação entre bactérias e plantas é baseada na troca de benefícios entre os organismos, onde a planta oferece compostos de carbono à bactéria e as bactérias auxiliam as plantas a sobreviverem, suprindo estas com nutrientes e proteção. Ainda assim, levando em consideração que ilhas restritas do continente são considerados ambientes preservados, com baixa taxa de impacto ambiental (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Rosindell et al., 2012), principalmente antropológico, podemos reforçar a ideia de que essa redução de diversidade bacteriana associada à *A. alcatrazense* esteja relacionado à um poder tampão do ambiente, explicando assim que a planta apenas se associa com microrganismos necessários a sua sobrevivência, sem necessidade de aquisição de novos microrganismos para auxiliar a tolerância as condições do ambiente (Dinsdale et al., 2008; Kier et al., 2009; Konopka et al., 2015).

Essas sugestões estão de acordo com os resultados observados no presente trabalho, no qual plantas coletadas em ambientes mais preservados (ilha de Alcatrazes e ambiente de Costão rochoso), apresentam relação diretamente proporcional a menor riqueza e diversidade bacteriana, comparativamente as plantas coletadas na Mata, pois estas habitam ambientes de alto impacto ambiental, normalmente com ocorrência de civilização humana (como o ambiente observado na Mata em Ubatuba São Paulo – Brasil), hospedando assim uma maior riqueza e diversidade de bactérias.

2.4.1 Relação entre a composição e estrutura da comunidade bacteriana associada a plantas endêmicas e seus parentes do mesmo gênero.

Neste trabalho nós observamos que a espécie endêmica *A. alcatrazense* (Nadruz-Coelho e Catharino, 2008) é colonizada por uma comunidade bacteriana particular mesmo quando comparada com a espécie *A. loefgrenii* coletada na mesma ilha. Estes resultados podem sugerir que a especiação tem levado à um parâmetro de seleção de microrganismos distintos. Também o mesmo padrão de isolamento

geográfico observado para os macrorganismos pode ocorrer para a estrutura da comunidade bacteriana habitando as folhas dessas plantas, mesmo necessitando de mais trabalhos baseados na composição gênica desses seres vivos para confirmar a hipótese de endemismo da comunidade bacteriana associada (Martiny et al., 2006). Em um estudo recente, Debnath et al., (2016), observaram haver uma comunidade bacteriana particular associada à *Rhododendron arboreum*, uma planta medicinal endêmica do sudeste himalaio. Neste trabalho foi assumido que a distribuição das plantas endêmicas tem alta correlação com os parâmetros do solo (pH, nitrogênio total e matéria orgânica), nicho de ocupação e assim concomitantemente ocorre seleção diferencial da composição da comunidade associada as plantas endêmicas. Esses padrões determinísticos de distribuição da comunidade bacteriana associada aos seus hospedeiros, tem sido descrito por muitos autores (Green et al., 2004; Martiny et al., 2006). Todavia, no nosso modelo de estudo foi observado que plantas não endêmicas como *A. loefgrenii*, também coletadas na ilha de Alcatrazes, apresentam uma comunidade bacteriana similar as plantas coletadas na região do Continente, mesmo estando distantes uma das outras. Esses resultados rejeitam a hipótese de distribuição espacial e reforçam a sugestão de que as características genotípicas e fenotípicas das plantas determinam o perfil da comunidade bacteriana associada. Também pode-se sugerir que a particularidade da comunidade bacteriana seja um efeito conjunto do isolamento geográfico e todo o período de especiação e ajuste da comunidade bacteriana e o desenvolvimento da planta. Essas sugestões corroboram as pressuposições dos padrões de associação da teoria do hologenoma onde variações genéticas no holobionte, podem advir de variações genéticas no hospedeiro e na comunidade bacteriana associada, sendo esta originária de seleção de novas linhagens de bactérias e/ou transferência horizontal de genes (Dinsdale et al 2008; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2013; Moran et al., 2015).

A maior parte dos estudos relacionados a análises da microbiota associada a plantas têm utilizado apenas um marcador molecular (genes ou regiões intergênicas) como base para inferir sobre a associação envolvendo a dinâmica de plantas e microrganismos. Os padrões observados pela identificação e ocorrência dos seres vivos, têm sido caracterizados como um dos mecanismos para entender processos naturais evolutivos, relacionados a dinâmica de comunidades e/ou população em um

ecossistema (evolução, especiação, imigração, extinção, declínio de populações) (Lankau et al., 2012; Nemergut et al., 2013; Debnath et al., 2016; Souza et al., 2016).

A maior parte dos estudos envolvendo a associação entre bactérias e plantas tem utilizado o gene 16S rRNA como marcador molecular padrão para identificação dos microrganismos, sugerindo que conhecer quem são os microrganismos envolvidos nesse processo de associação com a planta é o primeiro passo no entendimento da evolução do estabelecimento das associações (Pommier et al., 2007; Li et al., 2011; Godinho et al., 2013).

As plantas não podem mais ser consideradas como entidades simples, pois elas possuem uma grande diversidade de microrganismos associados tanto dentro como fora de seus tecidos (Vandenkoornhusem et al., 2015). Em uma busca extensiva pelo entendimento da diversidade bacteriana associada a plantas, foi observado que 96% de um total ($n = 7,348$ sequências de microrganismos associados a plantas), estão distribuídos entre os quatro filos mais abundantes (54% Proteobacteria, 20% Actinobacteria, 16% Firmicutes e 6% Bacteroidetes) (Hardoim et al., 2015; Vorholt et al., 2012; Bulgarelli et al., 2013). Estudos recentes demonstram que plantas da espécie *A. andraeanum* são colonizadas por Proteobacteria (39,8% de Gammaproteobacteria), Firmicutes (26,9%) e Actinobacteria (2,9%) (Sarria-Guzmán et al., 2016). Nossos resultados estão de acordo com estes resultados citados ao ponto que, de uma forma geral, foi observado que Proteobacteria responde por 54% da abundância de bactérias associadas, seguido de Actinobacteria (16%), Firmicutes (11%), Bacteroidetes (4%), além de terem sido obtidas muitas sequências não identificadas. De acordo com os procedimentos de qualificação/cura do nosso banco de dados (Caporaso et al., 2010b), essas sequências não classificadas podem ser consideradas como sequências ainda não conhecidas, ao invés de sequências de baixa qualidade. Um alto número de sequências não classificadas também foi observado por Charnock et al., (2016), estudando ambientes extremos, citando que essas podem ser oriundas de microrganismos não conhecidos. Ainda assim, essa diversidade de microrganismos não conhecidos podem se tornar foco de novas pesquisas (Langarica-Fuentes et al., 2015).

Examinando em um nível taxonômico mais profundo, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Bacilli foram os membros mais abundantes associados às plantas. Membros dessas classes, supracitadas, estão associados à uma diversidade de organismos que desempenham relações ecológicas que variam de mutualísticas à patogênicas, mesmo que em sua maioria são benéficos aos seus hospedeiros (Pini et al., 2011; Mendes et al., 2011; Hardoim et al., 2013; Golinska et al., 2015; Klann et al., 2016; Köberl et al., 2017).

Um resultado interessante observado no presente trabalho foi que plantas do gênero *A. alcatrazense* possuíram elevada abundância de Proteobacteria, representado por Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria (44% e 23% da microbiota associada, respectivamente), os quais ocorreram em diferentes frequências nas demais plantas analisadas. Adicionalmente, foi possível observar que apenas duas OTUs afiliadas à Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria ocorreram diferencialmente nas plantas de *A. alcatrazense* comparativamente as plantas coletadas no continente e a espécie *A. loefgrenii*, sugerindo que essas sequências são oriundas de bactérias que estão intimamente associadas as plantas endêmica desenvolvendo alguma função específica na sobrevivência e adaptação da planta.

Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria têm sido identificados como parte importante do microbioma das plantas (Köberl et al., 2017), normalmente descritos como antagonistas no biocontrole de patógenos bacterianos (Förnkrantz et al., 2012). Considerando que as plantas do gênero *A. alcatrazense* só ocorre na ilha em um local específico (Nadruz-Coelho e Catharino et al., 2008), sugere-se que essa biodiversidade, possua um papel crucial na interação e adaptação da planta as condições do ambiente (Berendsen et al., 2012). Por exemplo, em ambiente agrícolas, muito organismo pertencente a essas classes tem sido descrito como bactérias promotoras de crescimento vegetal, atuando como fixadores de nitrogênio, solublizadores de fosfato, produtores de fito- hormônios e no biocontrole de patógenos (Kuklinsky et al., 2004) características importantes para a manutenção da sobrevivência e elevada produção. Por outro lado, outros trabalhos têm descrito que organismos associados a essas classes, participam do microbioma core de alguns hospedeiros, sendo assim, participando das funções basais para garantir o desenvolvimento desses organismos (Horn et al., 2002; Neave et al., 2017).

Estudando microbiomas, foi observado que bactérias afiliadas à Gammaproteobacteria, estão intimamente associados a insetos e plantas desenvolvendo a processos basais como funções biogênese de células e resposta às condições de estresse (Hardoim et al., 2011; Bennett et al., 2014). Portanto, esses trabalhos corroboram as sugestões do nosso resultado ao ponto que, esses microrganismos são específicos do microbioma dessas plantas endêmicas desempenhando funções cruciais para a sobrevivência e adaptação na ilha de Alcatrazes.

Por outro lado, é interessante notar que as plantas coletadas no ambiente de mata apresentaram uma alta abundância de membros relacionados à classe Actinobacteria (32,34% em média), em comparação com as plantas coletadas em outros ambientes. Actinobacteria também é considerada parte importante do microbioma de plantas (Bulgarelli et al., 2013), contudo diferentemente de Gammaproteobacteria, são caracterizadas como bactérias Gram-positivas, capazes de produzir estruturas de resistência e tem sido observado em relativa elevada abundância em ambientes de Mata Atlântica, essas bactérias desempenham papel importante na decomposição de materiais complexos e reciclagem de nutrientes resultantes da formação de húmus. São microrganismos que produzem uma vasta gama de compostos antimicrobianos (Castillo et al., 2002; Ding et al., 2011) e quando em associação com a planta são descritos por controlar fungos patogênicos (Kloepper & Ryu, 2006). Apesar de não ser o foco do presente estudo, a composição das comunidades de Actinobacteria, descritas neste trabalho podem servir como fonte para pesquisas futuras de bioprospecção.

Muito trabalhos descrevem que a associação entre plantas e bactérias tem sido baseada nas características genótípicas do hospedeiro, podendo variar de simbiótica à mutualística e de comensal à patogênica (Kuklinsky et al., 2004; Mendes et al 2007; Hardoim et al., 2008; Andreote et al., 2010; Hardoim et al., 2015). A planta, tende a modular a seleção dos microrganismos para colonizar sua superfície ou seus tecidos internos de acordo com a sua composição de exsudatos (Vandenkoornhusen et al., 2015). A composição da exsudação é diferente entre as espécies de plantas, e variável quando estas são submetidas a condições ambientais distintas (Bulgarelli et al., 2013). Mendes e colaboradores (2011), trabalhando com solos supressivos e

condutivos, demonstraram que em condições de estresses a planta seleciona uma comunidade específica na rizosfera, para favorecer o controle de patógenos afetando a planta.

Alguns autores sugerem que as bactérias e plantas desempenham uma relação simbiótica muito forte e de alta dependência entre ambos (Moran & Sloan. 2015), no qual, variações nas abundâncias relativas dos grupos microbianos são mecanismos de adaptação e evolução do holobionte as condições do ambiente (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Vandenkoornhusen et al., 2015; Köberl et al., 2017). Neste mesmo contexto, nossos resultados demonstraram que a maior parte dos grupos de bactérias (OTUs), estão presentes em todas as plantas analisadas. Contudo, estes ocorrem em abundâncias distintas revelando a dissimilaridade entre as comunidades, principalmente relacionadas às OTUs afiliadas as classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. Esses resultados que indicam que plantas submetidas a processos evolutivos distintos caracterizado por ambientes geograficamente isolados um do outro, tendem a selecionar microrganismos distintos como forma de melhor se adaptar as condições limitantes.

Conclui-se, portanto que plantas que habitam regiões restritas, particularmente plantas do gênero *A. alcatrazense*, hospedam uma estrutura e composição da comunidade bacteriana associada específica. Esta característica de particularidade pode ser oriunda de processos bióticos e abióticos naturais de especiação e adaptação do genótipo dos microrganismos- genótipo do hospedeiro ao ambiente, podendo sugerir que podem uma melhor seleção de microrganismos que auxiliam a sobrevivência e adaptação hospedeiro as condições vigentes podem dirigir a associação simbiótica. Também pode-se concluir que Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria podem ser grupos, bacterianos associados, (97% similaridade), de relativa importância para os processos metabólicos das plantas de *A. alcatrazense*, pois estes apresentaram abundância maior que as plantas de *A. loefgrenii* coletadas na mesma ilha.

Assim, por fim pode-se sugerir que uma abordagem exploratória de comunidades bacterianas associadas a planta endêmicas, pode desvendar padrões de associação bactérias-plantas importantes e não conhecidos. Ainda assim, podem

ser utilizados como embasamento teórico para trabalhos cujo o objetivo é estudar processos genéticos dessa associação, assim como para bioprospecção de metabólitos inéditos, importantes para as áreas de biotecnologia.

Referências

- Adair KL, Douglas AE. (2017). Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology*. 35: 23-29.
- Andreote FD, da Rocha UN, Araujo WL, Azevedo JL, van Overbeek LS. (2010). Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*. 97: 389-399.
- Bennett GM, McCutcheon JP, MacDonald BR, Romanovicz D, Moran NA. (2014). Differential genome evolution between companion symbionts in an insect-bacterial symbiosis. *Molecular Biology*. Bio 5(5):e01697-14.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Science* 17:478–486
- Bisseling T, Dangl J L, and Schulze-Lefert P. (2009). Next-generation communication. *Science* 324:691.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, van Themaat EVL, Ahmadinejad N, et al. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root- inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 488: 91-95.
- Caporaso JG, Bittinger, K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, et al. (2010a) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*. Canada 26: 266–267.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello. E, K et al. (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methodologies*. 7: 335-336
- Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condrón MAM, Teplow DB, Stevens D, Yaver D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology*. 148:2675–2685.
- Charnock C, Nordille AL. (2016). Proteobacteria, extremophiles and unassigned species dominate in tape-like showhead biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47: 345-351.
- Debnath R, Yadav A, Gupta VK, Singh BP, Handique PJ, Saikia R. (2016). Rhizospheric bacterial community of Endemic *Rhododendron arboreum* Sm. Ssp. *Delavayi* along Eastern Himalayan slope in Tawang. *Frontiers in plant science* 7: 1345.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen, N, Rojas M, Brodie, EL, et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16 S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5069–5072

Dias ACF, Costa FEC, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira M A, Assumpção LC, Araújo WL, Azevedo JL, Melo I S. (2009) Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 189-195.

Ding L, Maier A, Fiebig H-H, Lin W-H, Hertweck C. 2011. A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Organic Biomolecular Chemistry* 9:4029–4031.

Dinsdale EA, Edwards RA, Hall D et al. (2008) Functional metagenomics profiling of nine biomes. *Nature* 452: 629–632.

Easson CG, Thacker RW (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology*. 5(532)

Edgar RC, Haas BJ, Clemente J.C, Quince C, Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194-2200,

Edgar RC. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19). 2460-2461.

Ezenwa VO, Gerardo NM, Inouye DW, Medina M, Xavier JB: Animal behavior and the microbiome. *Science* 2012, 338:198-199.

Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pelizzare FM, et al. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal*. 7: 1434-1451.

Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 108: 267-289.

Green J, Bohannan BJM. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*. 21(9): 501-507.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologica Electronica* 4:1–9

Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttillä AM, et al. (2015). The hidden world within plants: Ecological and Evolutionary considerations for defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Reviews*. 79(3): 293-320.

Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Cell press*. 16(10): 463-471

Kavamura VN, Taketani RG, Lançon MD, Andreote FD, Mendes, R, Melo IS. (2013) Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *PLoS One*, 8(9) e73606. doi:10.1371/journal.pone.0073606

- Kier G, Kreft H, Lee TM, Jetz W, Ibisch PL, Nowichi C, Mutke J, Bethlott W. (2009). Global diversity assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proceedings of National Academy of Science*. 106(23): 9322-9327.
- Klann J, Mchenry A, Mentelongo C, Goffredi SK. (2016). Decomposition of plant-sourced carbon compounds by heterotrophic betaproteobacteria isolated from tropical Costa Rica bromeliad. *Microbiology Open*. 5(3): 479–489.
- Kloepper JW, Ryu CM. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance, p 33–52. In Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (Ed), *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Köberl M, Dita M, Martinuz A, Staver C, Berg G. (2017). Members of Gammaproteobacteria as indicator species of healthy banana plants on *Fusarium* wilt-infested fields in Central America. *Scientific Reports*. 7:45318. doi: 10.1038/srep45318
- Konopka A, Lindemann S, Fredrickson J. (2015). Dynamics in microbial communities: unraveling mechanisms to identify principles. *The ISME Journal*. 9: 1488-1495.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, 6(12): 1244–51
- Lankau EW, Hong PY, Mackie RI. (2012). Ecological drift and local exposures drive enteric bacterial community differences within species of Galápagos iguanas. *Molecular Ecology*. 21: 1779-1788.
- Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 77:112–143.
- Mamede MCH, Silva SJG, Jacques EL, Arenque BC, (2012) In *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Instituto de Botânica, 132p
- Marques OAV, Martins M, Sazima I. (2002b). A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary Biology and conservation of Bothrops jararaca group (Serpentes, Viperidae), *Herpetologica*. 58(3): 303-312.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL et al. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 4: 102–112.
- Martiny, J. B. H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature reviews. Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 102–112, fev. 2006.
- Mendes R, Kruijt, M, De Bruijn, I et al (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*. 332:1097–1100.
- Mendes, R, Pizzirani-Kleiner AA, Araújo WL, Raaijmakers JM. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and environmental microbiology*, 73(22): 7259–67.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 634-663.

Moran NA, Sloan DB (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? PLoS Biology 13(12): e1002311.

Nadruz-Coelho MA, Catharino ELM. (2008). Duas espécies de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do Litoral de São Paulo, Brasil. Rodriguésia. 59(4): 829-833.

Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinsky TM, et al. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. Microbiology and Molecular Reviews 77(3): 342-356.

Pedrós-Alió C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? Trends in Microbiology. 14(6): 257-263.

Peralta AL, Mathews JW, Kent AD. (2014). Habitat specialization along a wetland moisture gradient differs between Ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms. Microbial Ecology. doi 10.1007/s00248-014-0407-4.

Phillippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nature Reviews in Microbiology. 11: 780-799.

Pini F, Galardini M, Bazzicalupo M, Mengoni A. (2011). Plant-Bacteria Association and symbiosis: Are there common genomic traits in Alphaproteobacteria. Genes. 2: 1017-1032.

Pommier T, Canbäck B, Riemann L, Boström KH, et al. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. 16: 867-880.

Prakamhang J, Minamisawa K, TeamTaisong K, Bookerd N, Teaumroong N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Applied Soil Ecology. 42: 141-149.

Rocha LCF, Smidt EC, Nadruz-Coelho MA, Temponi LG. (2014). The genus *Anthurium* (Araceae) in Parana State, Brazil

Rosindell J, Hubbell SP, He F, Harmon LJ, Etienne RS. (2012). The case for ecological neutral theory. Cell Press. 27(2): 203-208.

Sarria-Guzmán Y, Chávez-Romero Y, Gómez-Acata S, Montes-Molina A, et al (2016). Bacterial communities associated with different *Anthurium andraeanum* L.

Shi YW, Yang H, Zhang T, Sun J, Lou K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan Mountain. Applied Microbiology and Biotechnology. DOI: 10.1007/s00253-014-5720-9.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM.; Herndl GJ. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 103(32): 12115-12120.

Souza DT, Genuário DB, Silva FSP, Pansa CC, et al. (2017). Analysis of the bacterial composition in marine sponges reveals the influence of host phylogeny and environment. FEMS Microbiology Ecology. 93(1): doi: 10.1093/femsec/fiw204.

Temponi LG, Nadruz-Coelho MA. (2011). Two new species of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) for Brazil. *Rodriguésia*. 62(2): 315-320.

Thiers B, Index herbarium: A global directory of public herbaria and associated staff. New York: Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available in: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. Access in: April 15th 2017

Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, Heavens D, Alston M, Swarbreck D, Osbourn A, Grant A, Poole PS (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*. 7:2248-2258.

Van Elsas JD, Tam, L.; Finlay RD, Killham K, Trevors JT. (2006); Microbial interactions in soil. In: Van Elsas, J.D.; Jansson JK, Trevors JT. *Plant-Bacteria associated lifestyle and Molecular interactions*. 2nded. New York: CRC press, p 177-204.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser, A, Duhamed, M, Le Van, A, Defresne A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.13312

Vorholt JA. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews in Microbiology* 10:828–840. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2910>.

Wang Y, Qian P-Y. (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, 4(10). e7401, 2009.

Zilber-Rosenberg I and Rosenberg. E. (2008); Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenomic theory of evolution. *FEMS Microbiology reviews*. 32: 723-735.

3 IMPORTÂNCIA DA FILOGENIA E DO AMBIENTE NA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A CIANOACTÉRIAS

Resumo

O sucesso evolutivo das cianobactérias sempre foi atribuído a suas características genômicas. Contudo, estudos recentes demonstraram que as cianobactérias sempre estiveram associadas a outras bactérias, as quais participavam da ecologia destes organismos, podendo ser cruciais na ocupação de diferentes habitats. No entanto, pouco se sabe sobre a associação entre cianobactérias e outras bactérias, principalmente considerando cianobactérias oriundas de ambientes tropicais. Para isso, foram estudadas, por meio do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, as comunidades de bactérias associadas a diferentes linhagens dos gêneros *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis* e *Nostoc*. Primeiramente, foi observada uma correlação maior entre a estruturação da comunidade microbiana e a filogenia dos isolados estudados do que entre o local de isolamento e o meio de cultivo, onde estas foram mantidas em cultivo. Posteriormente, estudando apenas os isolados afiliados ao gênero *Microcystis*, foi demonstrada a variação na comunidade ao longo das fases de cultivo dos isolados, caracterizada por maior dominância de grupos bacterianos na fase estacionária do cultivo. Adicionalmente, foram encontradas distinções na composição da comunidade bacteriana quando as cianobactérias foram submetidas a condições de cultivo limitantes na concentração de nitrogênio, alteração da luminosidade e alteração na temperatura. Foi possível observar que os tratamentos com alteração de luminosidade obtiveram maiores valores de densidade ótica para o cultivo, resultando em uma estruturação de comunidade bacteriana distinta. Em conjunto, estas observações indicam uma íntima associação entre as cianobactérias e a comunidade bacteriana associada a estas.

Palavras-chave: Associação microrganismo-microrganismos; Cianobactérias-bactérias; Sequenciamento Ion Torrent; Gene 16S rRNA

Abstract

The evolutionary success of cyanobacteria has always been attributed to their genomic characteristics. However, recent studies have shown that cyanobacteria have always been associated with other bacteria, which participate in the ecology of these organisms, and may be crucial to occupy different niches. However, little is known about the association between cyanobacteria and other bacteria, especially considering cyanobacteria from tropical environments. For this, we studied the bacterial communities associated with different strains of the genera *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis* and *Nostoc*, through the massive sequencing of the 16S rRNA gene. Firstly, there was a greater correlation between the structure of the microbial community and the phylogeny of the isolates studied than between the isolation site and the culture medium in which they were kept in culture. Subsequently, only the isolates belonging to the genus *Microcystis* were used to study, the variation in the community during the cultivation phases of the

isolates was characterized by a greater dominance of bacterial groups in the stationary phase of culture. In addition, distinctions were found in the composition of the bacterial community when cyanobacteria were submitted to limiting culture conditions in nitrogen concentration, alteration of luminosity and temperature change. It was possible to observe that the treatments with alteration of luminosity obtained higher values of optical density for the culture, resulting in a structuring of different bacterial communities. Taken together, these observations indicate an intimate association between cyanobacteria and the bacterial community associated with them.

Keywords: Association microorganisms-microorganisms; Cyanobacteria-bacteria; Ion Torrent Sequencing; 16S rRNA gene

3.1 Introdução

As cianobactérias são organismos procarióticos, uni e multicelulares pertencentes ao filo Cyanobacteria, considerado como um grupo de organismos, que possuem uma longa história evolutiva (Whitton and Potts, 2000). A origem desses microrganismos data de cerca de 3,5 bilhões de anos (Schopf and Walter, 1982), período no qual a atmosfera terrestre era livre de oxigênio. Evolutivamente, sugere-se que essas bactérias tiveram papel fundamental na mudança da composição atmosférica terrestre, por possuir a capacidade de realizar a fotossíntese oxigênica (Whitton and Potts, 2000; Blankenship, 2002; Bekker et al 2004). Além disso, espécimes desse grupo também são capazes de realizar a fotossíntese não oxigênica (Shilo, 1980), resistir à presença de metais, baixa disponibilidade de oxigênio (Robinson et al., 2000) e altas concentrações de sulfureto (Padan & Cohen, 1982; Cohen et al., 1986); além de alguns grupos poderem usar H₂S como doador de elétrons (Cohen et al., 1975) e serem fixadores de nitrogênio (Farnelid et al., 2010). Essas estratégias de crescimento, e a versatilidade metabólica, foram algumas das particularidades que garantiram o sucesso evolutivo das cianobactérias (Garcia-Pichel & Pringault, 2001, Schirrmeister et al., 2011; Schirrmeister et al., 2013).

Esses organismos podem ser encontrados habitando quase todos os ambientes terrestre, desde ambientes comuns, tais como água doce, solo e ambientes epifíticos, até ambientes extremos, como águas termais, solos congelados, solos com alta temperatura, solos com faixa limites de pH, entre outros (Whitton & Potts, 2000; Komárek et al., 2012; Rigonato et al., 2013; Hoff-Risseti et al., 2013; Andreote et al., 2014; Genuário et al., 2015).

Por muitos anos, alguns autores sugeriram que o sucesso evolutivo das cianobactérias em habitar ambientes distintos estaria apenas relacionado às características fisiológicas e metabólicas e estruturais da própria cianobactéria (Paerl et al., 1996; Sanchez-Baracaldo et al., 2005; Genuário et al., 2013). Contudo, alguns trabalhos posteriores descreveram a comunidade bacteriana associada a estas cianobactérias, a qual anteriormente era considerada como contaminante dos cultivos destes organismos (Abed et al., 2005; Sánchez et al., 2005). A ocorrência destes organismos associados de forma ubíqua sugere sua participação no metabolismo das cianobactérias, e indica a possível ocorrência de importantes processos de complementação entre a célula das cianobactérias e as demais bactérias a essas associadas (Farnelid et al., 2010). Esse fato trouxe luz à importância da compreensão da interação mutualística entre cianobactérias e bactérias associadas (Al-Hasan et al., 2002; Brauer et al 2015). Atualmente, sabe-se que essas bactérias possuem papel fundamental como facilitadoras do desenvolvimento das cianobactérias frente a condições estressantes abióticas e bióticas, promovendo o ajustes metabólico do hospedeiro; enquanto as cianobactérias, por sua vez, fornecem abrigo em suas estruturas celulares e nutrição aos simbiossiontes, por meio de compostos orgânicos simples derivados da fotossíntese e nitrogênio oriundo da fixação biológica (Sanchez et al., 2005; Leloup et al., 2009; Parveen et al., 2013).

Estudos recentes trouxeram grandes avanços na compreensão dos fatores ecológicos que modulam a interação entre cianobactérias e bactérias heterotróficas. Trabalhos distintos mostraram que: (i) as cianobactérias são “*hot-spots*” para o desenvolvimento e atividade de comunidades bacterianas associadas (Worm and Sondergaard, 1998); (ii) a diversidade associada à cianobactérias em geral é composta por membros dos grupos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides) e Verrucomicrobia (Berg et al., 2009); (iii) o perfil bacteriano pode ser modulado pelo tipo de toxina produzida pela cianobactéria (Kolmonen, Sivonen, Rapala, & Haukka, 2004); (iv) a estrutura, composição e diversidade da comunidade bacteriana associada são distintas da comunidade bacteriana presente no ambiente adjacente à cianobactéria (Parveen et al., 2013); (v) a estrutura da comunidade associada também é variável de acordo com o hospedeiro e as condições ambientais (Dziallas &

Grossart, 2011; Bagatini et al., 2014; Louati et al., 2015; Zhu et al., 2016). Apesar desses estudos recentes, informações sobre bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias ainda são escassas, principalmente quando consideradas cianobactérias de ambientes tropicais e linhagens cultivadas. Portanto, as hipóteses deste estudo são: (a) a estrutura e composição das comunidades de bactérias associadas às cianobactérias cultivadas são determinadas pela filogenia do hospedeiro; (b) essa comunidade se altera em relação as fases de desenvolvimento do cultivo das cianobactérias; e (c) alterações nas condições de cultivo das cianobactérias promovem alterações no seu crescimento e consequentemente na estrutura da comunidade bacteriana associada. Para tanto, três objetivos foram delineados: (1°) correlacionar a composição das comunidades de bactérias associadas às cianobactérias aos grupos taxonômicos/distâncias filogenéticas analisadas e aos locais de origem dos isolados estudados; (2°) determinar a diferenciação da comunidade bacteriana nas fases de desenvolvimento de uma cultura de cianobactéria; (3°) verificar alterações na composição das comunidades bacterianas devido a alterações nas condições de cultivo das cianobactérias

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Linhagens de cianobactérias utilizadas

Foi realizada uma seleção de 18 linhagens de cianobactérias, compondo 6 gêneros, dos quais foram escolhidas 3 linhagens representantes para cada gênero, oriundos de diferentes ambientes (Tabela 3.1). Todas estas linhagens foram previamente identificadas filogeneticamente com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. Estas sequências foram utilizadas no presente estudo para calcular as distâncias filogenéticas entre as linhagens, determinada pelo número de substituição de bases, derivado da aplicação do modelo de máximo verossimilhança sobre o alinhamento das sequências realizado no software MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

Tabela 3.1- Dezoito linhagens de cianobactéria afiliadas taxonomicamente a seis gênero distintos, ambientes de coleta, data de coleta e meios de cultivo, onde as culturas são mantidas.

<i>Taxonomia</i>	<i>Identificação</i>	<i>Coleta/ Amb. Isol.</i>	<i>Meio cultivo</i>	<i>N. Acesso 16S rRNA</i>
<i>Microcystis sp.</i>	NPJL4	1996/AD	ASM1	JQ771624
<i>Microcystis sp.</i>	NPCD1	1992/AD	ASM1	EU815063
<i>Microcystis sp.</i>	SPC777	2000/AD	ASM1	EF121241
<i>Brasilonema sp.</i>	UFV_L1	2008/FIL	BG0	EF117246
<i>Brasilonema sp.</i>	CENA347	2012/FIL	BG0	KT731163
<i>Brasilonema sp.</i>	PINNUS	2008/FIL	BG0	KR137603
<i>Cylindrospermopsis sp.</i>	CENA303	2008/AD	BG0	JQ707292
<i>Cylindrospermopsis sp.</i>	CENA302	2009/AD	ASM1	JQ707291
<i>Cylindrospermopsis sp.</i>	CENA305	2009/AD	ASM1	JQ707293
<i>Nostoc sp.</i>	CENA107	2003/AD	BG11	EF088341
<i>Nostoc sp.</i>	CENA88	2004/AD	BG0	GQ259207
<i>Nostoc sp.</i>	CENA69	2004/SOL	AA	KR137577
<i>Leptolyngbya sp.</i>	CENA299	2010/SOL	BG11	KF246502
<i>Leptolyngbya sp.</i>	CENA104	2005/AD	BG11	EF088339
<i>Leptolyngbya sp.</i>	CENA359	2010/FIL	BG11	KR137580
<i>Limnothrix sp.</i>	CENA110	2005/AD	BG11	EF088338
<i>Limnothrix sp.</i>	CENA217	2006/AD	BG50	KF246506
<i>Limnothrix sp.</i>	CENA74	2003/AD	ASM1	EF088336

*AD –água doce; FIL – filosfera; SOL – solo; Amb. Isol – Ambiente de isolamento

As linhagens foram cultivadas por 36 dias em condições de irradiância/Fotoperíodo de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 14h:10h claro/escuro e temperatura de 21°C. Após 36 dias de cultivo, volumes de 6 ml de cada cultivo foram

concentrados por centrifugação à 20.000 x *g* por 10 min. O material precipitado foi armazenado à – 20 °C para obtenção do DNA.

3.2.2 Extração do DNA e sequenciamento massivo da região V6 do gene 16S rRNA e análises das sequências

Para obtenção do DNA genômico (cianobactéria e bactérias heterotróficas), 1,5mL de solução tampão (Tris-HCl 10mM + EDTA 1mM, pH 8,0) foi adicionado aos precipitados, os quais foram então submetidos à um choque térmico, utilizando nitrogênio líquido e banho aquecido (70° C), repetido por 3 vezes. A partir da suspensão formada procedeu-se a extração do DNA genômico, utilizando o kit *Power Soil DNA Extraction* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído, assim como sua quantificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v) em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5µl dos DNAs extraídos junto a 3µl de um tampão de corrida *Loading buffer 6x* (Azul de bromofenol 0,05% (p/v); Sacarose 40% (p/v); EDTA 0,1M (pH 8,0); SDS 0,025% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta (*DNr Bio-imaging Systems Minibis pro 16mm*).

Os procedimentos de sequenciamento massivo da região V6 do gene 16S rRNA, análise das sequências obtidas, análises alfa e beta-diversidade e taxonomia da estrutura e composição de grupos bacterianos associados à cianobactéria foram realizadas como descrito no item 2.2.4, 2.2.5 e 2.2.6 presentes no capítulo 2. As principais diferenças entre os estudos estão no fato de que não houve uma amplificação (reação de PCR inicial), para eliminação do 16S rRNA Cloroplastidial e os bancos de sequências obtidos no presente trabalho, foram filtrados em relação ao filo "*Cyanobacteria*". Estas sequências foram removidas e apenas as afiliadas a outros filos bacterianos foram utilizadas nas análises posteriores.

3.2.3 Análise de correlação entre a filogenia das cianobactérias e a estrutura da comunidade bacteriana associada

Para validar a conexão entre dos grupos bacterianos em associação com os determinados gêneros de cianobactéria, foi determinada a correlação entre as matrizes de distâncias filogenéticas entre os isolados de cianobactérias e a matriz de dissimilaridade das comunidades bacterianas associadas (Kembel et al., 2010; Easson and Tracker, 2014). O teste de correlograma de Mantel foi realizado utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis da comunidade bacteriana e a matriz de distância filogenética entre as linhagens de cianobactéria, utilizadas no presente estudo. Os dados foram previamente transformados em $\text{Log}(X+1)$ para se adequarem à normalidade.

3.2.4 Variação das comunidades bacterianas associadas ao longo do cultivo das cianobactérias

Para esta análise foram utilizadas quatro linhagens de *Microcystis aeruginosa* (NPCD-1; NPJL-4; SPC 777; SPC 759). Inicialmente, foi definida uma curva padrão de multiplicação celular para estas linhagens, inoculando (2 mL; 2,86 mL; 1,66 mL; 3,46 mL) do cultivo das cianobactérias, respectivamente, com a finalidade de ajustar os volumes de inóculo de acordo com a densidade óptica (680nm) de cada isolado. Posteriormente, as linhagens foram mantidas em câmara de cultivo sob irradiância/fotoperíodo de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 14:10h claro/escuro e temperatura de 21°C. Estas linhagens foram cultivadas por um período de 43 dias. A densidade ótica (OD) foi determinada em espectrofotômetro à 680nm em intervalos de 3 em 3 dias para determinação da curva padrão de multiplicação de cada isolado.

Com base nestas curvas, foram definidos ao longo do cultivo das cianobactérias, três pontos de amostragem: fase Lag (10 dias), fase Log (36 dias) e fase estacionária (43 dias). Em cada uma destas fases, cada uma das quatro culturas, realizadas em 3 repetições, foram amostradas, onde 6 ml foram coletados e submetidos aos procedimento de extração do DNA, como descrito acima nos itens (3.2.2), posteriormente, os procedimentos de sequenciamento massivo da região V6 do gene

16S rRNA, análise das sequências obtidas, e análises alfa e beta-diversidade e taxonomia da estrutura e composição de grupos bacterianos associados à cianobactéria foram realizadas como descrito no item 2.2.4, 2.2.5 e 2.2.6 presente no capítulo 2, e descrita anteriormente no item 3.2.2.

3.2.5 Variações nas condições de cultivo das cianobactérias

No intuito de verificar as variações nas comunidades bacterianas associadas quando as cianobactérias experimentam diferentes condições ambientais, foram alteradas algumas condições de cultivo dos isolados alvos de estudo e as comunidades bacterianas presentes em cada um dos tratamentos foram então estudadas. As condições de cultivo foram alteradas em quantidade de nitrogênio, irradiância/luminosidade e temperatura (Tabela 3.2).

Tabela 3.2- Cinco condições distintas de cultivos para as quatro linhagens de *M. aeruginosa*. A variação das condições de cultivo, foram baseadas nas condições controle de cultivo, descrita no tratamento C1 (Control).

Tratamento	Meio de Cultura	Irradiância ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Temperatura (°C)
(Control) - Controle	BG11	30	21
(10% N)	BG11 10% Nitrogênio	30	21
(50% N)	BG11 50% Nitrogênio	30	21
(60 light)	BG11	60	21
(25°C)	BG11	30	25

Previamente ao início do experimento, as quatro linhagens de *M. aeruginosa* foram aclimatadas nas condições de cada tratamento por um período de 36 dias, até atingirem o estágio de maior desenvolvimento celular, compreendendo o final da fase Log. Amostras da fase de aclimação foram coletadas para servir de inóculo para o desenvolvimento do experimento. Além da amostragem que deu origem ao inóculo, aos 36 dias de cultivo foram realizadas amostragens em todas as condições de cultivo distintas, gerando um total de 84 amostras.

Da mesma maneira, seis mililitros de cada cultivo foram coletados e processados conforme descrito nos itens (3.2.2; 3.2.4).

3.3 Resultados

3.3.1 Alfa e beta-diversidade das comunidades bacterianas associadas aos gêneros de cianobactérias

Os valores de estimativos dos índices de diversidade (Riqueza, Diversidade e Dominância) demonstraram não haver diferenças significativas, considerando a médias dos tratamentos ($n = 3$), entre as comunidades associadas aos gêneros de cianobactérias (Tabela 3.3).

Tabela 3.3- Descrição da estimativa de alfa-diversidade, valor dos índices de Chao1, Shannon e Simpson, para os gêneros de cianobactérias analisados. Os valores indicam as médias ($n = 3$) seguidas dos valores de desvio padrão. A letras indicam diferenças estatística ($p < 0,05$) entre os gêneros.

Gênero	Chao1 (S')	Shannon (H')	Simpson ($1-D'$)
<i>Brasilonema</i> spp.	293,62 (20,36) ^a	3,89 (0,37) ^a	0,84 (0,04) ^a
<i>Cylindrospermopsis</i> spp.	376,63 (129,29) ^a	3,77 (0,98) ^a	0,80 (0,11) ^a
<i>Leptolyngbya</i> spp.	372,40 (74,31) ^a	3,86 (0,14) ^a	0,84 (0,02) ^a
<i>Limnothrix</i> spp.	334,03 (122,82) ^a	3,51 (1,36) ^a	0,81 (0,15) ^a
<i>Microcystis</i> spp.	354,97 (223,00) ^a	2,94 (1,49) ^a	0,67 (0,23) ^a
<i>Nostoc</i> spp.	199,89 (121,81) ^a	2,04 (1,05) ^a	0,46 (0,32) ^a

Na análise de beta-diversidade, representada pela PCoA, foi possível observar que a estrutura da comunidade bacteriana é distinta entre os gêneros de cianobactérias analisados (Permanova = 1,55; $p = 0,001$; Anosim; $R = 0,70$; $p = 0,0001$). Contudo, alguma sobreposição ocorre principalmente entre os gêneros *Brasilonema*, *Nostoc*, *Leptolyngbya*, e *Limnothrix*, ao passo que os gêneros *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* apresentaram a maior dissimilaridade, dentre os analisados

Não foi observado separação significativa quando considerado o meio de cultivo original no qual a linhagem é mantida sendo cultivada desde o período de sua coleta no ambiente (Permanova; $Pseudo-F = 1,06$, $p = 0,226$; Anosim; $R = 0,10$; $p = 0,222$), e também não houve uma separação das comunidades com validade estatística para os ambientes de origem das linhagens (Permanova; $Pseudo-F = 0,66$, $p = 0,126$; Anosim; $R = 0,04$; $p = 0,32$) (Figura 3.1).

Figura 3.1- Análise de Coordenadas principais (PCoA), baseada numa matriz de beta-diversidade de Bray-Curtis, descrevendo a estrutura da comunidade bacteriana associada à seis gêneros de cianobactéria. Os valores nos dois primeiros principais eixos indicam a explicação (22,8%) para a distribuição dos pontos.

3.3.2 Composição taxonômica da comunidade bacteriana associada as cianobactérias

A partir do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, foi obtido um total de 591.140 sequências válidas após o processo de filtragem de sequências por qualidade. Depois da exclusão das sequências oriundas do filo “*Cyanobacteria*”, a “OTU table” foi normalizada em 2.240 sequências por amostra. Índices de cobertura Good’s obtidos foram, em média, $96,90 \pm 0,004$, $96,22 \pm 0,01$, $96,30 \pm 0,006$, $96,7 \pm 0,01$, $95,52 \pm 0,02$, $97,94 \pm 0,09$, para os as amostras do gênero *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis* e *Nostoc*, respectivamente.

As classificações taxonômicas abrangeram 19 filos bacterianos e 44 classes, além das sequências não classificadas. De forma geral, Proteobacteria (55%) e Bacteroidetes (42%) e Chlorobi (4%) foram os mais abundantes apresentando

abundância acima de 2%. Considerando ao nível taxonômico de classe observou-se que os principais grupos associados aos gêneros de cianobactérias analisados foram Alphaproteobacteria (35%), Betaproteobacteria (17%), Gammaproteobacteria (11%), Flavobacteria (10%), Cytophaga (7%), Sphingobacteria (5%), Saprospirae (4%) e OPB56 (4%). As demais classes apresentaram abundância relativa menor do que 2% (Figura 3.2A).

Em relação à distribuição dos grupos mais abundantes, ao nível de classe, foi possível observar que não houve diferença significativa para Alphaproteobacteria. Contudo, Betaproteobacteria foi mais abundante nos isolados pertencentes aos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya* e *Microcystis* (27%; 28%; 34%) ($p < 0,05$) comparativamente à abundância em *Brasilonema*, *Limnothrix*, *Nostoc* (5,0%; 4,4%; 1,2%). De forma análoga, sequências afiliadas a classe Gammaproteobacteria foram mais abundantes em *Brasilonema*, *Limnothrix*, *Nostoc* (16%; 11%; 30%), Flavobacteria foi mais abundante em *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis* e *Nostoc* (11%; 22%; 28%). A classe Cytophagia foi mais abundante em *Brasilonema*, *Leptolyngbya* e *Nostoc* (11%; 11%; 13%). Sphingobacteria foi mais abundante em *Limnothrix* e *Leptolyngbya* (11%; 17%), a classe OPB56 foi mais abundante em *Microcystis* (18%) (Figura 3.2B). Não houveram diferenças significativas para a classe Saprospirae.

Figura 3.2- Abundância relativa (%) de sequências do gene de 16S rRNA das bactérias associadas às cianobactérias (classificadas taxonomicamente no nível de Filo e Classe). (A) Média da abundância relativa de grupos bacterianos presentes nos tratamentos (gêneros de cianobactéria; n=3) (B) Valores de abundância relativa encontrados para cada uma das 18 linhagens estudadas.

Ao examinarmos a composição da comunidade bacteriana associada em nível taxonômico mais profundo, como por exemplo ao nível de OTUs (geradas a 97% de similaridade), identificamos a ocorrência de alguns grupos específicos em cada gênero de cianobactéria (Figura 4). Por exemplo, as OTUs denovo3883 (Betaproteobacteria), denovo 6182 (OPB56), são mais abundantemente representadas por sequências oriundas de *Microcystis* em relação aos demais gêneros avaliados; denovo4083 (Flavobacteria) e denovo2073 (Gammaproteobacteria) foram mais representativas no gênero *Nostoc* e denovo5473 (Betaproteobacteria) foi mais representativa no gênero *Cylindrospermopsis* (Figura 3.3). De maneira geral, cada gênero de cianobactéria apresentou OTUs que foram específicas e em elevada abundância.

OTU id	taxonomy	<i>Brasilonema</i> spp.	<i>Limnothrix</i> spp.	<i>Microcystis</i> spp.	<i>Leptolyngbya</i> spp.	<i>Cylindrospermopsis</i> spp.	<i>Nostoc</i> spp.	Test-Statistic	p-value
denovo3883	(Betaproteobacteria)	0,0	0,0	730,0	345,3	2,3	0,0	2475,835727	1,25E-07
denovo4083	(Flavobacteria)	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	679,3	2425,687965	6,43E-07
denovo2073	(Gammaproteobacteria)	0,0	0,0	0,0	7,0	0,3	674,3	2354,964487	2,73E-10
denovo5473	(Betaproteobacteria)	0,0	0,0	0,3	0,0	457,3	0,0	1630,418041	1,68E-12
denovo6182	(OPB56)	0,0	0,0	452,3	0,0	0,0	0,0	1616,77505	4,83E-05
denovo4027	(Alphaproteobacteria)	0,3	452,3	134,0	264,0	0,3	0,7	1343,628675	2,79E-07
denovo2746	(Gammaproteobacteria)	327,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	1160,744735	4,50E-09
denovo5179	(Flavobacteria)	189,0	0,0	0,0	0,0	323,7	0,0	1159,597467	1,67E-05
denovo4379	(Alphaproteobacteria)	324,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1152,12086	9,76E-06
denovo1694	(Cytophagia)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	315,3	1125,837611	2,97E-12
denovo4437	(Sphingobacteria)	0,0	301,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1076,863547	1,11E-05
denovo931	(Sphingobacteria)	0,3	0,0	0,0	262,3	0,0	0,0	932,0187219	9,76E-14
denovo4542	(Sphingobacteria)	0,0	0,0	70,0	0,0	220,7	0,0	786,6043945	1,67E-05
denovo4127	(Cytophagia)	21,3	0,0	0,0	206,3	0,0	0,0	670,790175	1,93E-06
denovo153	(Gammaproteobacteria)	0,0	208,0	0,0	42,3	0,0	0,0	666,431001	1,22E-15
denovo1745	(Flavobacteria)	0,0	0,0	0,0	0,0	170,7	0,0	607,4348455	5,24E-12
denovo4104	(Alphaproteobacteria)	205,7	94,0	214,0	128,3	0,3	0,0	582,1819544	6,50E-07
denovo4188	(Alphaproteobacteria)	1,7	0,0	0,0	7,0	0,0	176,7	581,9884487	5,70E-06
denovo1549	(Alphaproteobacteria)	0,0	0,0	159,7	0,7	1,0	0,0	553,3380588	5,40E-13
denovo2896	(Cytophagia)	125,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	444,9921594	6,90E-09
denovo293	(Saprospirae)	0,0	0,0	0,0	0,0	120,7	0,0	428,2705479	1,67E-15
denovo3055	(Leptospirae)	0,0	26,7	0,0	0,0	127,3	0,0	406,8343869	7,35E-09
denovo4160	(Saprospirae)	0,0	130,7	3,0	19,3	0,0	0,0	400,4126822	2,34E-06
denovo3940	(Alphaproteobacteria)	0,0	0,0	5,3	111,3	0,0	0,0	371,0374398	1,25E-07
denovo1596	(Betaproteobacteria)	42,3	0,0	0,0	138,0	14,0	5,3	367,0327622	1,68E-12
denovo4574	(Betaproteobacteria)	0,0	0,0	0,0	92,3	0,0	0,0	326,7496431	1,67E-05
denovo1935	(Betaproteobacteria)	1,3	94,3	0,0	0,3	0,0	0,3	318,4288112	7,10E-11
denovo4490	(Alphaproteobacteria)	0,0	0,0	83,0	0,0	0,0	0,0	293,3092511	1,67E-05
denovo110	(Sphingobacteria)	0,0	75,7	0,0	0,0	0,0	0,0	267,0356434	9,99E-16
denovo5286	(Fimbrimonadial)	0,0	0,0	69,3	50,3	0,0	0,0	263,3961298	9,53E-13
denovo5539	(Saprospirae)	74,7	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	260,4367652	1,68E-12
denovo4460	(Alphaproteobacteria)	0,3	1,3	0,7	15,7	87,3	0,7	254,2866706	1,53E-05

Figura 3.3- A abundância de sequências afiliadas as principais OTUs influenciando a dissimilaridade entre as comunidades bacterianas associadas aos diferentes gêneros de cianobactéria, foi descrita com base no teste de Simper. A soma da contribuição dessas OTUs correspondeu à 90% da dissimilaridade total. Os valores indicam a abundância de sequências, e a significância dos testes estatísticos ($p < 0,05$). As cores indicam uma escala de abundância de sequências, rosa escuro alta abundância variando até azul escuro baixa abundância.

3.3.3 Relação filogenética entre cianobactérias e a estrutura da comunidade bacteriana associada

Por meio de um teste de Mantel as distâncias filogenéticas entre as linhagens de cianobactérias foram correlacionadas com a dissimilaridade das estruturas das comunidades bacterianas associadas. Foi encontrada uma correlação positiva entre a filogenia dos hospedeiros e a estrutura da comunidade bacteriana associada ($p = 0,002$). Usando o teste de correlograma de Mantel, observou-se que a correlação foi confirmada para curtas distâncias filogenéticas entre os hospedeiros ($R^2 = 0,669$; $p = 0,002$), ou seja, quanto menor as distâncias filogenéticas entre as linhagens, maior a explicação da estruturação da comunidade bacteriana associadas as cianobactérias (Figura 3.4). Estes resultados indicam que existe dissimilaridade significativa de acordo com o gênero da cianobactéria e possivelmente com a espécie de cianobactéria.

Figura 3.4- Correlograma de Mantel avaliando o sinal filogenético entre o log da matriz de distância “Bray-Curtis” da estrutura da comunidade bacteriana e o log da distância filogenética das cianobactérias (hospedeiras) baseada no gene 16S rRNA. O eixo “X”, indica, valores crescentes da distância filogenéticas entre as linhagens analisadas. O eixo “Y” indica os valores de correlação de mantel. As barras indicam os valores de correlação obtidos

3.3.3 Alterações na multiplicação celular dos isolados de *M aeruginosa* e sob diferentes condições de cultivo

Não foram observadas diferenças significativas nas curvas de multiplicação celular entre as linhagens avaliadas (Figura 3.5), o que permitiu delimitar de forma eficiente e equitativa os pontos de amostragem para o estudo das comunidades bacterianas associadas como fases Lag (10 dias), Log (36 dias) e estacionária (43 dias). Contudo, foram observadas diferenças significativas entre as fases de crescimento de cada linhagem, ou seja, estagio zero < Fase Lag < Fase Log < Fase Estacionária.

Figura 3.5- Curvas de multiplicação de *M. aeruginosa* (NPJL 4; SPC 777; NPCD 1; SPC 759), compreendendo fase Lag 10 dias após inoculação; fase Log 36 dias, fase Estac (Estacionária), 43 dias de cultivo. As barras indicam o desvio padrão das médias entre as amostras em triplicatas, em cada fase foram medidas da densidade óptica (680nm), e um ponto foi amostrado em cada fase.

Em relação às variações nas condições de cultivo na fase log, avaliada aos 36 dias de multiplicação, pode-se observar que não houve diferenças de taxas de multiplicação entre as linhagens na condição controle (Control). Ainda assim, cada linhagem da espécie *M. aeruginosa* apresentou um comportamento específico de multiplicação, variável dentro de cada uma das condições de cultivo (10% N, 50% N, 60 Light e 25 C), em que foram submetidas (Figura 3.6).

A linhagem NPJL 4 apresentou maior taxa de multiplicação quando submetida a condição 60 Light (1,94) em relação ao controle (0,80), enquanto que apresentou taxa de multiplicação semelhante ao controle nas outras condições (Figura 3.6A). A linhagem SPC 777 apresentou taxas de multiplicação estatisticamente similares com o controle (0,92), apesar de haver diferença entre as condições (60 light – 1,25, 50% N – 1,18) e (25 C – 0,64), (Figura 3.6B). A linhagem NPCD 1 apresentou aumento da

taxa de multiplicação na condição 60 light (2,14), em comparação com as outras condições, as quais, foram semelhantes ao controle (0,72) (Figura 3.6C). A linhagem SPC 759 apresentou multiplicação maior para a condição 60 light (1,32) > 50% N (0,93) > Controle, 10% N e 25 C (0,70). Em resumo geral, as linhagens não apresentaram crescimento menor que a condição controle, quando submetidas as condições analisadas (10% N, 50% N, 60 Light e 25 C).

Figura 3.6- Avaliação da multiplicação celular das linhagens de *M. aeruginosa*, medidas por densidade ótica (680nm), quando cultivadas em cinco condições de cultivo distintas (Control; 10% N; 50% N; 60 light; 25°C). (A) NPJL 4, (B) SPC 777, (C) NPCD 1, (D) SPC 759). Barras seguidas de mesma letra maiúscula indicam ausência de diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) entre linhagens em cada condição. Barras seguidas de mesma letra minúscula indicam ausência de diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), entre as condições analisadas

3.3.4 Valores de alfa diversidade das comunidades bacterianas associadas a *M. aeruginosa* ao longo de seu desenvolvimento e sob distintas condições de cultivo

O sequenciamento massivo do 16S rRNA utilizado nesta etapa do estudo gerou um total de 1.072.848 sequências válidas do gene 16S rRNA após trimagem por qualidade. Depois da exclusão das sequências oriundas do filo "*Cyanobacteria*", a *OTU table* foi normalizada em 4.240 sequências por amostra. Os índices de cobertura de *Good's* foram: NPJL 4 - $96,0 \pm 0,04$, SPC 777 - $96,56 \pm 0,01$, NPCD 1 - $97,30 \pm 0,006$, SPC 759 - $95,52 \pm 0,02$.

Considerando as fases de desenvolvimento das cianobactérias, pode-se observar que a dinâmica diversidade bacteriana foi diferente para cada linhagem de cianobactéria, refletido pelos índices de Chao1, Shannon e Simpson. A linhagem NPJL 4 apresentou menor de riqueza de grupos bacterianos no início do desenvolvimento fase lag, seguido do aumento dos valores de Chao1 para a fase log e estacionária, esse aumento foi também observado para os índices de Shannon e Simpson. A linhagem SPC 777, também apresentou menores valores dos índices de Chao1 e Shannon, Simpson nas primeiras fases de multiplicação, comparado com os valores maiores na fase estacionária. A linhagem NPCD 1, apresentou valores de Chao1, Shannon e Simpson mais similares entre as fases de multiplicação ($p < 0,05$). A linhagem SPC 759, apresentou valores de Chao1, Shannon e Simpson maiores na primeira fase em comparação com a fase estacionária ($p < 0,05$) (Tabela 3.4). De forma geral pode-se observar uma relação positiva dos valores do índice de Shannon (dominância de grupos bacterianos) com o desenvolvimento das culturas das cianobactérias ($R = 0,66$; $p < 0,003$).

Tabela 3.4- Descrição da estimativa de alfa-diversidade, valores dos índices de Chao1, Shannon e Simpson, para os estágios de multiplicação de cada linhagem NPJL 4 e SPC 777 (acima); NPCD 1 e SPC 759 (abaixo). Os valores indicam as médias seguidas dos valores de desvio padrão. As letras indicam a diferenças estatística (p< 0,05) em relação as fases de desenvolvimento de cada cianobactéria.

		NPJL 4			SPC 777		
<i>Fases</i>		<i>Chao 1 (S')</i>	<i>Shannon (H')</i>	<i>Simpson (1 - D')</i>	<i>Chao 1 - (S')</i>	<i>Shannon - (H')</i>	<i>Simpson (1 - D')</i>
<i>Inóculo</i>	453 (60,9) ^b	2,6 (0,01) ^d	0,61 (0,03) ^b	245,5 (61,8) ^b	2,3 (0,07) ^a	0,62 (0,01) ^a	
<i>Lag</i>	278,0 (99,7) ^b	2,18 (0,15) ^c	0,53 (0,11) ^b	239,4 (26,6) ^b	1,3 (0,07) ^b	0,30 (0,03) ^b	
<i>Log</i>	937,3 (203,1) ^a	3,1 (0,01) ^b	0,63 (0,03) ^b	482,5 (3,53) ^a	2,9 (0,02) ^a	0,64 (0,01) ^a	
<i>Estac*</i>	829,0 (155,1) ^a	4,4 (0,12) ^a	0,91 (0,01) ^a	483,6 (2,56) ^a	2,9 (0,01) ^a	0,64 (0,01) ^a	
		NPCD 1			SPC 759		
<i>Fases</i>		<i>Chao 1 - (S')</i>	<i>Shannon - (H')</i>	<i>Simpson (1 - D')</i>	<i>Chao 1 - (S')</i>	<i>Shannon - (H')</i>	<i>Simpson (1 - D')</i>
<i>Inóculo</i>	387 (9,5) ^b	2,2 (0,07) ^b	0,5 (0,006) ^b	590,4 (30,97) ^a	3,4 (0,02) ^b	0,83 (0,06) ^a	
<i>Lag</i>	387,8 (17,8) ^b	2,6 (0,03) ^a	0,7 (0,008) ^a	545,9 (30,97) ^a	3,1 (0,42) ^b	0,73 (0,06) ^c	
<i>Log</i>	472,8 (19,0) ^a	2,5 (0,09) ^b	0,5 (0,01) ^b	295,2 (7,95) ^c	2,8 (0,03) ^b	0,75 (0,01) ^b	
<i>Estac*</i>	383,8 (2,2) ^b	2,7 (0,11) ^a	0,6 (0,11) ^{ab}	479,0 (14,93) ^b	3,6 (0,07) ^a	0,78 (0,01) ^a	

* Fase Estacionária

Considerando as condições de cultivos as quais as cianobactérias foram submetidas, foi possível observar diferenças significativas entre os valores dos índices de riqueza (Chao1 – S'), diversidade (Shannon - H') e dominância (Simpson – $1-D'$) da comunidade bacteriana associada, comparativamente com a comunidade bacteriana associada na condição controle. Não houveram diferenças estatísticas para os índices de diversidade analisados para a linhagem NPJL 4, em relação ao controle. Contudo, para a linhagem SPC 777, foi observado uma diversidade e dominância estatisticamente ($p < 0,05$) maior ao controle quando submetida à condição 25° C (Tabela 3.5).

Para as linhagens NPCD 1 e SPC 759 apenas foram observados valores de Shannon e Simpson maiores ou iguais nas condições 10% N; 50% N; 60 light; 25°C em relação ao controle (Tabela 3.5).

Estes resultados demonstram que cada linhagem de cianobactéria apresenta padrão distinto de relação ecológica com a diversidade bacteriana associada. Ainda assim, analisando comparativamente os índices de diversidade e as taxas de multiplicação celular destas linhagens (Figura 3.6), os resultados indicam que, em situações adversas ao controle, como as quais os hospedeiros foram submetidos, a cianobactéria promove uma modulação da diversidade bacteriana favorecendo o desenvolvimento de mais grupos de bactérias a se tornarem dominantes.

Tabela 3.5- Descrição da estimativa de alfa-diversidade, valores dos índices de Chao1, Shannon e Simpson, para a comunidade bacteriana associada à NPJL 4 e SPC 777 (acima); NPCD 1 e SPC 759 (abaixo), submetidas as cinco condições de cultivo distintas (Control; 10% N; 50% N; 60 light; 25°C). Os valores indicam as médias seguidas dos valores de desvio padrão. As letras indicam a diferenças estatística (p< 0,05) em relação as fases de desenvolvimento de cada cianobactéria.

NPJL 4				SPC 777		
Condições	Chao 1 - (S')	Shannon - (H')	Simpson (1 - D')	Chao 1 - (S')	Shannon - (H')	Simpson (1 - D')
Control	804,62 (255,3) ^{ab}	2,83 (0,6) ^{ab}	0,75 (0,03) ^a	637,65 (91,9) ^a	1,94 (0,28) ^b	0,43 (0,05) ^{bc}
10% N	885,46 (466,2) ^{ab}	3,46 (0,94) ^{ab}	0,78 (0,04) ^a	424,79 (97,3) ^{ab}	1,36 (0,14) ^c	0,33 (0,03) ^c
50% N	904,64 (598,3) ^a	2,54 (0,52) ^b	0,57 (0,09) ^b	369,36 (130) ^{ab}	1,99 (0,66) ^{bc}	0,48 (0,18) ^{bc}
60 light	280,5 (108) ^b	3,13 (0,53) ^{ab}	0,78 (0,01) ^a	288,05 (120,4) ^b	2,06 (0,36) ^b	0,58 (0,14) ^b
25 ° C	593,61 (238,8) ^{ab}	3,61 (0,31) ^a	0,75 (0,17) ^a	645,81 (198) ^a	3,13 (0,26) ^a	0,77 (0,008) ^a
NPCD 1						
SPC 759						
Condições	Chao 1 - (S')	Shannon - (H')	Simpson (1 - D')	Chao 1 - (S')	Shannon - (H')	Simpson (1 - D')
Control	534,61 (320) ^a	2,44 (0,12) ^b	0,59 (0,02) ^c	363,51 (118) ^{ab}	2,84 (0,013) ^d	0,75 (0,01) ^b
10% N	336,61 (21,8) ^a	3,27 (0,32) ^a	0,78 (0,04) ^{ab}	476,50 (70) ^a	3,20 (0,02) ^c	0,74 (0,02) ^b
50% N	457,51 (108) ^a	3,14 (0,3) ^a	0,77 (0,01) ^b	246,61 (27) ^b	2,55 (0,016) ^e	0,71 (0,01) ^b
60 light	637,16 (158) ^a	3,47 (0,28) ^a	0,80 (0,01) ^a	265,17 (75,5) ^b	3,69 (0,09) ^a	0,76(0,06) ^{ab}
25 ° C	897,19 (697,9) ^a	3,476 (0,5) ^a	0,77 (0,17) ^{abc}	345,70 (73) ^{ab}	3,27 (0,01) ^b	0,81 (0,01) ^a

A composição das comunidades bacterianas associadas aos isolados de *M. aeruginosa* é variável de acordo com a fase de crescimento destes organismos. As classificações taxonômicas das sequências geradas encontraram 19 filos e 44 classes, além das sequências não classificadas. Dentro desse panorama, a composição das comunidades bacterianas foi descrita com base nas classes que apresentaram abundância relativa geral $\geq 2\%$. Para a linhagem NPJL 4 (Betaproteobacteria 55%; Alphaproteobacteria 33%; OPB56 6% e Fimbriimonada 3%) (Figura 3.7A) foram as mais abundantes. Para a linhagem SPC 777 (Betaproteobacteria 58%; Alphaproteobacteria 24% e Flavobacteria 15% e Actinobacteria 2%) (Figura 3.7B); para a linhagem NPCD 1 (Betaproteobacteria 45%; Alphaproteobacteria 25%; Flavobacteria 21%, Sphingobacteria 4%, Gammaproteobacteria 2% e Fimbriimonada 2%) (Figura 3.7C); e para a linhagem SPC 759 (Betaproteobacteria 33%; Flavobacteria 26%; Alphaproteobacteria 19%; Gammaproteobacteria 12%; Opitutae 5% e Sphingobacteria 2%) (Figura 3.7D).

Em resumo, foi possível observar uma dinâmica de grupos ao longo das fases de multiplicação das cianobactérias. Por exemplo, o grupo Betaproteobacteria apresenta uma alta abundância nas fases iniciais de cultivo das cianobactérias, com subsequente redução na fase estacionária. A redução de Betaproteobacteria sempre esteve acompanhada de um aumento significativo de, especificamente Alphaproteobacteria para linhagem NPJL 4, Flavobacteria para a linhagem SPC 777, NPCD 1 e SPC 759. Por fim, para a linhagem SPC 759, foi observado o aumento da abundância de Gammaproteobacteria (Figura 3.7D).

Foi interessante notar que a classe Flavobacteria apresentou baixa abundância relativa na fase lag para as linhagens SPC 777 e NPCD 1 e SPC 759 e tornou-se dominante na fase estacionária. Pode-se também inferir que as linhagens SPC 777 e NPCD 1 e SPC 759 apresentam similaridades em relação a dinâmica de grupos relacionado a suas fases de desenvolvimento.

Ainda assim foi possível observar que alguns grupos como Fimbriimonada, OPB56, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Opitutae e Sphingobacteria, especificamente para linhagens foram considerando grupos que apresentaram abundância relativa baixa e constante durante as fases de crescimento das cianobactérias.

Figura 3.7- Variação da frequência relativa dos grupos de bactérias mais abundantes observados em associação com cada uma das quatro linhagens de *M. aeruginosa*. As retas representam a variação da porcentagem de cada grupo de acordo com as fases de crescimento de cada linhagem. Os pontos representam os estágios de multiplicação das cianobactérias. O inóculo representa a comunidade bacteriana obtida no inóculo (fase de Aclimatação). (A) NPJL-4; (B) SPC 777; (C) NPCD-1 e (D) SPC 759. As barras indicam o desvio padrão da abundância relativa em cada fase de crescimento

Aos 36 dias de cultivo as linhagens de *M. aeruginosa*, estas foram submetidas a condições de cultivo distintas, incluindo uma condição controle (Control). Analisando o comportamento da comunidade bacteriana associada, quando o hospedeiro é submetido a condições de cultivo distintas e limitantes, foi possível observar que as linhagens NPJL 4 e NPCD 1 apresentaram um perfil de grupos bacterianos

semelhante ao controle, quando submetidas as condições 25°C e 50% N (Anosim, $r = 0,25$, $p = 0,001$). Ao passo, que as linhagens apresentaram o mesmo padrão de estruturação da comunidade bacteriana quando as cianobactérias foram submetidas as condições 10% N (Anosim, $r = 0,78$, $p = 0,0001$) e 60 light (Anosim, $r = 0,86$, $p = 0,0001$) (Figura 3.8A e C).

Estes padrões de estruturação da comunidade bacteriana associada não foram observados para as outras linhagens de cianobactérias (SPC 777 e SPC 759). Estas últimas apresentaram uma estruturação de comunidade particular e específica de acordo com as condições de cultivo (50% N e 60 light). Especificamente para a linhagem SPC 777, a estrutura da comunidade bacteriana associada foi descrita por uma maior similaridade quando o hospedeiro foi submetido as condições *Control*, 25°C e 10% N e 25°C ($r = 0,35$, $p = 0,001$) e comparativamente com o controle, maior especificidade quando submetida na condição 50% N ($r = 0,72$, $p = 0,0001$) e 60 light ($r = 0,70$, $p = 0,0001$) (Figura 3.8B).

Para a linhagem SPC 759, foi possível observar uma maior dissimilaridade entre a comunidade bacteriana associada as amostras *Control*, 10% N, 25°C e 50% N ($r = 0,32$, $p = 0,001$), em relação a amostras do tratamento 60 light (Figura 3.8D).

Ainda assim relacionando os dados apresentados na figura 3.6 com a estrutura da comunidade bacteriana associada, pode-se observar que o tratamento 60 light influenciou o crescimento da cianobactéria e também favoreceu uma maior dissimilaridade destas amostras com todas as outras. Por outro lado, a condição 25°C, foi limitante para o crescimento das cianobactérias, pois todas as linhagens apresentaram crescimento semelhante ao controle, e correlatamente, a estrutura da comunidade bacteriana foi semelhante a comunidade bacteriana das amostras controle.

Esses dados foram validados por um teste de Mantel ($R = 0,70$; $p < 0,002$). Ainda assim a condição com alteração da porcentagem de nutrientes no meio tem uma influência variável, pois a dissimilaridade da comunidade não foi semelhante para todas as linhagens.

Figura 3.8- Análise de Coordenadas principais (PCoA), baseada numa matriz de beta-diversidade de Bray-Curtis, descrevendo a estrutura da comunidade bacteriana associada às 4 linhagens de *Microcystis aeruginosa*; (A) NPJL 4; (B) SPC 777; (C) NPCD 1 e (D) SPC 759, quando submetidas a condições de cultivo distintas (Control – Azul escuro; 10%N – Verde; 50%N – Cinza; 60 light – Azul Claro; 25°C – Amarelo). Os valores nos dois primeiros principais eixos indicam a explicação para a distribuição dos pontos. Uma forma geral, os resultados obtidos na figura 3.9 indicaram que Alphaproteobacteria (25%) e Betaproteobacteria (67%) compõem os grupos bacterianos mais abundantes em associação com as linhagens de cianobactérias. Ainda assim, observou-se que quando os hospedeiros são submetidos a condições distintas e limitantes para o crescimento, esses grupos bacterianos associados apresentam em abundância relativa variável comparativamente às abundâncias relativas observadas quando as mesmas linhagens são submetidas à condição controle.

Especificamente, para a linhagem NPJL 4 foi possível observar que quando a cianobactéria foi submetida a condição 60 light, houve um acréscimo na abundância relativa da classe Cytophagia (29%) seguido de uma redução na abundância relativa de Betaproteobacteria (1%), diferentemente do controle onde observou-se (1%) e (67%), respectivamente. Também se observou que a maior dissimilaridade observada para as amostras submetidas ao tratamento 10% N, está relacionado a maior abundância de Betaproteobacteria (79%) e baixa abundância de Alphaproteobacteria (11%) comparativamente à condição controle. Por fim, houve uma maior similaridade entre a abundância relativa (em média) de Alphaproteobacteria (34%) e Betaproteobacteria (50%) e OPB56 (6%) quando a

cianobactéria foi submetida a condição 10% N e 25° C e estas foram similares a condição controle (Figura 3.9A).

Para a linhagem SPC 777, foi possível observar que quando a cianobactéria foi submetida as condições 50% N e 60 light, apenas foi observado a presença de Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, apesar de esses grupos apresentarem abundância relativas distintas em cada condição de cultivo. Ainda assim, ocorreu uma maior similaridade entre a composição bacteriana associada a cianobactérias, considerando as condições Control, 10% N e 25° C (Figura 3.9B). Isto foi representado por abundancia similares das classes Alphaproteobacteria (~25%), Betaproteobacteria (~67%) e Actinobacteria (~8%)

Analizando a figura 3.8A e 3.8C, pode demonstrar que ambas as cianobactérias apresentam um padrão de estruturação da comunidade bacteriana semelhante. Analogamente, analisando a figura 3.9A e 3.9C, mostra-se que apesar de apresentarem padrões de estruturação de comunidade semelhantes, estas cianobactérias apresentam composições de comunidades distintas. Neste caso, não houveram diferenças significativas entre as abundâncias relativas de Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria nas condições Control, 50% N e 25° C. Por outro lado as maiores diferenças foram obtidas para as condições 10% N, representada Flavobacteria (23%) e Sphingobacteria (19%), valores estatisticamente distintos dos valores obtidos para a condição controle. Também para a condição 60 light foi observado uma alta porcentagem de Betaproteobacteria (76%) e Fimbriimonada (5%) distintos do controle ($p < 0,05$). Estes resultados podem sugerir uma especificidade metabólica entre os grupos bacterianos e as linhagens de cianobactéria.

Para a linhagem SPC 759, foi observado que houve uma elevada abundância do grupo Flavobacteria em todas as condições de cultivo. Este grupo apresentou maior abundância apenas em associação com esta linhagem de cianobactéria diferentemente ($p < 0,05$) das outras linhagens. Também foi observado que as condições Control, 10% N, 50% N e 25° C apresentaram uma maior similaridade entre elas relacionado aos grupos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Opitutae. Por fim, houve uma maior diferença quando a

cianobactéria foi submetida a condição 60 light, onde foi observado uma elevada abundância de *Sphingobacteria* (32%) ($p < 0,05$) (Figura 3.9D).

Estes resultados em conjunto, indicam que a comunidade bacteriana é modulada de acordo com as condições de cultivo adversas, as quais, as cianobactérias são submetidas, comparativamente com uma condição controle/ideal de multiplicação das cianobactérias. Por fim, foi possível observar uma relação positiva existente entre os valores de densidade ótica da multiplicação das cianobactérias e as estruturas de comunidades observadas quando o hospedeiro é submetido a condições de cultivo distintas hospedeiro. Demonstrando que a variação das taxas de multiplicação do hospedeiro é acompanhada por variações na estrutura e composição das comunidades bacterianas associadas.

Figura 3.9- Classificação taxonômica dos grupos bacterianos associados, (abundância relativa (%)), as linhagens de *M. aeruginosa* (A) NPJL-4; (B) SPC 777; (C) NPCD-1; (D) SPC 759. O eixo X, representa as condições de cultivos as quais as linhagens foram submetidas. (Control - C1; 10%N – C2; 50%N – C5; 60 light – C3; 25°C – C4). (A) NPJL-4; (B) SPC777; (C) NPCD-1; (D) SPC 759.

3.4 Discussão

3.4.1 Relação entre a filogenia das cianobactérias e composição e estrutura das comunidades bacterianas associadas

No presente trabalho foi observada uma correlação positiva entre a estrutura da comunidade bacteriana e as características filogenéticas dos hospedeiros, ambas baseadas no gene 16S rRNA. Esses resultados demonstram pode haver um sinal filogenético, ou uma relação do gênero do hospedeiro com sua comunidade associada, sugerindo que todas as características fenotípicas e genotípicas e fisiológicas obtidas ao longo da história evolutiva das cianobactérias possuíam papel chave para a modulação da estrutura da comunidade bacteriana associada. Adicionalmente, também foi mostrado que quanto menor a distância filogenética entre as linhagens, aqui utilizadas, maior é esse sinal filogenético, sugerindo que possivelmente a espécie da cianobactéria também seja um fator determinante para a estrutura da comunidade bacteriana associada. O gene 16S rRNA ou ITS são considerados genes conservados entre o grupo de microrganismos e têm sido normalmente utilizados como meio para descrever a filogenia entre grupos distintos (XX). Neste caso, recentemente com os avanços dos estudos de interação entre microrganismos e hospedeiros aliado aos avanços nas tecnologias de sequenciamento, pesquisadores tem sugerido que correlações positivas entre a comunidade microbiana e as distâncias filogenéticas dos hospedeiros podem indicar um panorama de co-evolução entre ambos microrganismos e hospedeiros, podendo apenas sugerir estatisticamente sobre a biologia da relação ecológica. Neste contexto, Easson e Thacker (2014) observaram um forte sinal filogenético entre a comunidade bacteriana associada a esponjas com a filogenia e identidade dos hospedeiros. Ainda assim, Bouffaud et al 2014, mostrou uma relação positiva entre as distâncias filogenéticas de plantas da família *Poaceae* com a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Portanto, esses dados corroboram nossa sugestão de que cianobactérias sempre apresentaram uma comunidade bacteriana específica e está desempenhando algum papel importante de complementação de seu metabolismo.

Neste estudo foi observado que a comunidade bacteriana associada às cianobactérias, de uma forma geral, é composta por alta abundância dos grupos taxonômicos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria, Sphingobacteria, Saprospirae, Cytophagia e OPB56. A maioria das classes identificadas neste estudo foram semelhantes àsquelas observadas em trabalhos anteriores de comunidades bacterianas associadas com cianobactérias (Maruyama et al., 2006; Lemes et al., 2008; Manage et al., 2009b; Manage et al., 2010). No entanto, foram observadas algumas diferenças na composição da comunidade comparativamente a esses trabalhos citados, o que por sua vez, podem estar relacionadas com as estratégias de sequenciamento, ou por estarem sendo analisadas cianobactérias oriundas de ambientes tropicais.

Muitos trabalhos sugerem que existe uma íntima associação simbiótica entre cianobactérias e bactérias heterotróficas (Abed et al., 2005; Fitzsimons et al., 2007), sugerindo certa especificidade entre cianobactéria-comunidade bacteriana associada (Grossart et al., 2005; Bagatini et al., 2014), e que essa especificidade é dependente da identidade do hospedeiro. Esses trabalhos corroboram os nossos resultados, que demonstram que a identidade da cianobactéria é um fator determinante na composição da comunidade de bactérias heterotróficas. Neste contexto Louati et al. (2015) mostrou que cianobactérias afiliadas a *Microcystis spp.* e *Anabaena spp.* apresentaram perfis distintos das comunidades bacterianas associadas.

Neste mesmo contexto, vale ressaltar no presente trabalho o enriquecimento da classe OPB56, representado pela OTU denovo6182, observado especificamente nas linhagens de *Microcystis spp.*, o que não foi relatado em nenhum dos trabalhos prévios relacionados a este tema. OPB56 é uma classe pertencente ao filo Chlorobi, a qual não possui membros cultivados, o que dificulta inferências sobre sua funcionalidade nos ambientes em que se encontram (Hiras et al., 2015). Esses autores, baseado numa análise filogenética e funcional, demonstraram que a classe OPB56 forma uma clado monofilético com as *Chlorobea* e *Iganvibacteria* e as bactérias verde-sulfurosas, apresentando uma relação evolutiva e filogenética com o filo Bacteroidetes. É descrito que estas bactérias possuem clusters gênicos relacionados à ciclagem de C e N, podendo atuar na complementação de processos

metabólicos relacionados as transformações de C e N (Zhu et al., 2016), auxiliando o desenvolvimento da cianobactéria.

Validando as sugestões acima citadas e corroborando as sugestões, alguns outros autores relatam que as bactérias heterotróficas do complexo bacteriano *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* tem papel fundamental em consumir parte da microcistina produzida por algumas linhagens de cianobactérias tóxicas, como forma de aliviar as condições dentro da célula evitando a sua morte (Brunberg, 1999; Maryuama et al., 2003). Louati et al. (2015) sugere que a composição comunidade bacteriana é dependente do gênero da cianobactéria, potencialmente da espécie das cianobactérias e suas capacidades metabólicas.

Liu et al. (2016), estudando a relação entre filogenia de árvores subtropicais e de sua comunidade de fungos patógenos associada, explicitam que essa associação patogênica pode ser oriunda tanto de uma co-evolução entre a ocorrência da associação entre plantas e fungos, como espécies de fungos se a associaram a hospedeiros espacialmente distribuídos, mas possuindo parâmetros filogenéticos semelhantes e preferências por habitat. Por outro lado, Sison-Magnus et al., 2014 analisando à associação entre diatomáceas marinhas e sua comunidade microbiana, sugeriu um processo de especificidade de hospedeiros e co-adaptação, demonstrando que diferentes genótipos de *Pseudo-nitzschia* hospedam estrutura e composição de comunidades microbianas distintas. Ainda assim, Bouffaud et al. (2014) observaram uma correlação positiva entre a distância filogenética e a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas da família *Poaceae*. Essa relação positiva pode ser o elo explicativo da co-evolução entre filogenia e função, na interação entre hospedeiros e microrganismos (Provorov & Vorobyov, 2009; Kinkel et al., 2011; Gilbert & Webb, 2007). Apesar de serem avaliados em organismos distintos, estes últimos trabalhos suportam as sugestões levantadas no presente estudo, de que a história evolutiva das cianobactérias pode ter dirigido a associação com a comunidade microbiana.

3.4.2 Alteração da estrutura e composição da comunidade bacteriana ao longo das fases de crescimento da cianobactéria

A segunda hipótese deste trabalho é que a comunidade bacteriana associada é alterada ao longo das fases de crescimento do hospedeiro quando este é submetido à diferentes condições abióticas. Para tal, seguindo os resultados observados sobre a comunidade associada a gêneros de cianobactérias já apresentados, nós selecionamos apenas um gênero para responder as hipóteses seguintes. Neste caso foi selecionado o gênero *Microcystis* spp., pois compreendem cianobactérias capazes de formar florações em água paradas de reservatórios e também são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários, tais como a toxina microcistina e outros (Nicolaus et al., 1999; Kirkwood et al., 2006). Além disso, tem sido o foco de diversos estudos ecológicos (Humbert et al., 2009; Kaplan et al., 2015) devido a sua alta prevalência em muitos ecossistemas ao redor do mundo (Paerl, 1996; Eiler et al., 2004). O gênero *Microcystis* apresenta uma organização colonial e uma matriz mucilaginosa ao redor da sua célula, composta de uma vasta gama de compostos carbonáceos e polissacarídeos como: glicose, manose, fucose, xilose, galactose e ramnose (Anemiya et al., 1990; Worm and Sondergaard, 1998;), os quais oferecem um nicho em potencial para comunidades de bactérias heterotróficas e um suporte físico para o estudo de interação microrganismo- hospedeiro (Zhu et al., 2016). Mesmo assim, informações sobre a dinâmica de grupos bacterianas associados a cianobactérias mantidas em coleções de culturas, são escassas e podem apresentar um panorama de processos de dependência microrganismos-hospedeiros.

Os resultados obtidos, no presente trabalho demonstraram que a diversidade bacteriana é variável de acordo com as fases de desenvolvimento da cianobactéria, desde a fase de adaptação (fase lag) até a fase estacionária. Também foi observado uma maior dominância de grupos bacterianos na fase estacionária. Estes resultados podem sugerir que o comportamento da comunidade bacteriana está relacionado ao processo de estabilização das principais mudanças físicas e metabólicas ocorrida nas primeiras fases de crescimento da cianobactéria, relativas a multiplicação celular e a taxa de produção de metabólitos secundários, inferências citadas por Shi et al., 2012; Sheng et al., 2013; Leloup et al., 2013; Brauer et al., 2015, Bagatini et al., 2014; Louati.

et al 2015; Zhu et al., 2016 e nós usamos com embasamento teórico para nossas sugestões.

Também pode-se observar, que os grupos de bactérias flutuaram entre alta abundância para baixa abundância e vice-versa. Estudos prévios corroboram os resultados encontrados no presente trabalho. Por exemplo Bagatini et al., (2014) mostrou que Betaproteobacteria foi um dos grupos mais abundantes, nas fases iniciais do multiplicação de linhagens de *M. aeruginosa*, mas sua contribuição relativa decresceu até a última fase de desenvolvimento da cianobactéria, em contraste a classe Alphaproteobacteria que foi o segundo grupo mais abundante, e aumentou em abundância, desde as fases iniciais ao longo da curva de crescimento da cianobactéria, além de outros grupos bacterianos que apresentavam abundância < 1% em média, e passaram à apresentar elevada abundância nas fases finais e vice e versa.

Pedros-Aliós, 2006 descreve que a biodiversidade total de um ecossistema é formada por táxons abundantes e raros e que o balanço do ecossistema é determinado pela flutuação desses dois grupos de acordo com as condições abióticas vigentes. Esse contexto permeia a associação entre cianobactérias e bactérias heterotróficas apresentada neste trabalho, ao ponto que a presença transitória de alguns grupos bacterianos de baixa abundância durante o desenvolvimento das cianobactérias, como por exemplo Flavobacteria (SPC 777; NPCD-1; SPC 759), OPB56 (NPJL 4), Sphingobacteria (NPCD 1; SPC 759), Opitutae (SPC 759) e Fimbriimonada (NPJL 4). Alguns autores sugerem que essa dinâmica de flutuação entre grupos transitórios e abundantes está relacionada a microrganismos especialistas que mudam de acordo com os estágios de desenvolvimento do hospedeiro e fatores bióticos, tais como composição de exsudatos, em resposta às características genótípicas específicas dos hospedeiros em cada etapa de seu desenvolvimento (Haukka et al 2006; Becker et al., 2014; McFrederick et al., 2014).

Estes resultados em conjunto podem sugerir que ocorreu um processo de sucessão ecológica ao longo do desenvolvimento do hospedeiro, consequentemente levando a uma estabilização da estrutura da comunidade, correlacionado com o período de maior crescimento da cianobactéria, sendo este o início da fase

estacionária. Esses processos de sucessão ecológica e estabilização de comunidades microbianas e seleção de grupos de acordo com a fisiologia do hospedeiro são bem fundamentados em ecologia de comunidades microbianas em ambientes em transição (Dini-Andreote et al., 2016), na associação de patógeno-hospedeiro (Thrall et al., 2003) e na manutenção de patógenos no solo em relação a dinâmica da diversidade bacteriana (van Elsas et al., 2012). Não foram observados trabalhos que descrevessem o papel da sucessão ecológicas de grupos bacterianos associados ao desenvolvimento de cianobactérias cultivadas oriundas de coleção de culturas. Assim demonstrando o pioneirismo do trabalho.

3.4.3 Alteração da estrutura e composição da comunidade bacteriana associada a cianobactérias quando esta é submetida a condições abióticas distintas

Os resultados observados neste trabalho corroboram a hipótese de que alterações nas condições de cultivo de *M. aeruginosa*, promovem alterações no seu crescimento e consequentemente promovem alterações na sua estrutura da comunidade bacteriana associada.

Paerl, (1996) comparou florações de cianobactérias em três ambientes aquáticos distintos, e elucidou que alguns fatores ambientais como principalmente, temperatura ($>20^{\circ}\text{C}$ e $< 25^{\circ}\text{C}$), quantidade excessiva ou limitantes de (N) e Irradiância, são fatores cruciais que influenciam diferentemente, limitando ou favorecendo o crescimento e desenvolvimento das cianobactérias e produção de toxinas, referente à sua capacidade metabólica e fisiológica (Reynolds et al., 1987; Bentley & Meganathan, 1991; Wasby 1992; Paerl & Millie, 1996).

Segundo a *World Healthy Organization* (1998), a formação de florações de *Microcystis aeruginosa* são influenciadas por fatores físicos, químicos e biológicos e que esses fatores determinam os níveis de cianobactéria e de suas toxinas no ambiente. Por exemplo cita-se que a temperatura ótima para o desenvolvimento de *Microcystis aeruginosa* inclui uma faixa entre 20 e 25°C , sendo essa faixa ideal para a produção de toxinas e que essas temperaturas citadas são limítrofes para o

crescimento das cianobactérias (Chorus & Bartram, 1999), justificando a escolha de uma temperatura ideal para avaliação das variações do crescimento da cianobactéria. O aumento da intensidade luminosa acima de 40 microeinstein/ m². s⁻¹ está diretamente relacionado ao aumento das taxas de multiplicação de *M. aeruginosa*, também relacionado ao aumento da biomassa e produção de toxinas no ambiente (Mitrovic et al., 2001; Brookes et al., 2003). Muitas cianobactérias estão associadas com quantidades elevadas de nutrientes, e isso leva a uma redução nas proporções das florações (Chorus & Bartram, 1999). Como já descrito na literatura e corroborado nos nossos dados, as cianobactérias respondem as variações ambientais as quais são submetidas e essas respostas são acompanhadas por variações em seu microbioma associado.

Trabalhos prévios corroboram os resultados observados neste presente trabalho, afirmando que a comunidade bacteriana associada à *Microcystis* spp. são significativamente diferente quando a cianobactéria é submetida a temperaturas distintas (Dziallas & Grossart, 2011). Neste mesmo contexto, Eiler et al., (2004), já tinha demonstrado que florações de cianobactérias em ambientes que possuem condições abióticas distintas, apresentam comunidade bacterianas distintas. Parveen et al., (2013), demonstrou que as cianobactérias selecionam microrganismos específicos do ambiente adjacente com o intuito de promover o seu desenvolvimento e a sua tolerância as condições limitantes do meio.

Neste mesmo contexto, Louati et al., (2015), sugeriu que cianobactérias fixadoras e não fixadoras de nitrogênio possuem comunidades bacterianas distintas, e que a seleção bacteriana é direcionada para auxiliar a cianobactérias em seus processos metabólicos. Em trabalho, subsequente, Zhu et al., (2016), por meio de análise metagenômica, confirmou a presença de genes relacionados à dinâmica de carbono e nitrogênio, e que esses genes estavam associados à comunidade bacteriana. Esses trabalhos exemplificam a íntima relação ecológica que ocorre entre bactérias heterotróficas e cianobactérias em ambientes naturais e como a comunidade se comporta em relação a sobrevivência do hospedeiro (Abed et al., 2005; 2009). Sugerindo que cianobactérias de ambientes naturais quando em situações estressantes selecionam microrganismos específicos na sua ficosfera, termo análogo

a rizosfera ou micosfera, para auxiliar em seu desenvolvimento e garantir a sobrevivência do hospedeiro (Bagatini et al., 2014).

Entretanto, no presente trabalho foram utilizadas linhagens da espécie *M. aeruginosa* oriundas de uma coleção de cultivo, subentendendo que não há fonte de seleção de novos microrganismos do ambiente, e os microrganismos em associação são aqueles que foram adquiridos verticalmente por meio dos sub-cultivos. Sendo assim, sugere-se que as rápidas alterações na estrutura da comunidade bacteriana associada a cianobactérias cultivadas em condições distintas, é resultado de processos de auto regulação entre comunidade microbiana e hospedeiros envolvidos na interação simbiótica onde processos de auto regulação permeiem a associação entre linhagens de *M. aeruginosa* e bactérias heterotróficas. (van Elsas, Jansson & Trevors, 2006). Desta forma, observa-se uma modulação em termos de abundância dos microrganismos associados como forma de garantir a sobrevivência da associação ou aliviar as condições abióticas limitantes do ambiente, mantendo o balanço do ecossistema formado pela interação entre cianobactérias e bactérias. Estas sugestões se baseiam no fato de que as cianobactérias não apresentaram redução no processo de multiplicação em relação a condição controle (ideal), ao ponto de indicar que a cianobactéria estaria morrendo. Neste contexto, nosso trabalho está de acordo também com as observações feitas para corais e esponjas marinhas, descrevendo que variações na estrutura e composição de comunidade bacterianas como mecanismo para garantir a resiliência de espécies de corais (Webster et al., 2001; Buddemeier et al., 2004; Rosenberg et al., 2007).

Este processo de interação mutualística microrganismo-hospedeiros tem sido majoritariamente descrito para a associação entre procariotos e eucariotos (Animais e Plantas). Essas unidades de interação são definidas pelo termo Holobionte (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Moran & Sloan, 2015; Vandenkoornhusen et al., 2015). A teoria do hologenoma de onde deriva o termo holobionte ou “superorganismos”, sugere que quando ocorrem variações na fisiologia do hospedeiro em resposta as variações nas condições bióticas ou abióticas, as comunidades microbianas associadas irão acompanhar essas alterações, ao ponto de favorecer adaptação e sobrevivência do holobionte como um todo, garantindo um balanço no ecossistema (Youle et al., 2013; Mendes et al., 2013).

A luz do nosso conhecimento, estes conceitos têm apenas sido aplicados para a associação entre eucariotos e procariotos (Singh et al., 2013; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2013; Krediet, Ritchie & Paul, 2013; Berg, Krause & Mendes, 2015; Sweet & Bulling, 2017). Sendo assim, de acordo com os resultados observados e toda a literatura considerada, nós sugerimos que esta teoria citada também possa abordar as interações entre microrganismos-microrganismos, procariotos-procariotos, especificamente cianobactérias e bactérias.

Referências

- Abed RMM, Köster J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 55: 29-37.
- Abed RMN, Bobrestov S, Sudesh K. (2009); Applications of cyanobacteria in Biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1-12.
- Adam, B., Klawonn, I., Svedén, J. B., Bergkvist, J., Nahar, N., Walve, J., et al. (2016). N₂-fixation, ammonium release and N-transfer to the microbial and classical food web within a plankton community. *The ISME Journal*. 10: 450–459.
- Al-Hasan, RH, Sorkhoh, NA, Al-Bader, DA, Radwan, SS (1994) Utilization of hydrocarbon by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 615–619
- Bagatini, I. L., Eiler, A., Bertilsson, S., Klaveness, D., Tessarolli, L. P., and Vieira, A. A. H. (2014). Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. *PLoS ONE* 9:e85950.
- Bekker A, et al. (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427(6970):117–120.
- Berg KA, Lyra C, Sivonen K, Paulin L, Suomalainen S, Tuomi P, Rappala J. (2009). High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal*. 3: 314-325.
- Blankenship RE (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (Blackwell Science, Oxford).
- Bouffaud, ML, Poirer MA, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2014) Root microbiome relates to plant host evolution. *Environmental Microbiology*, 16, 2804-2814
- Brauer, V. S., Stompe, M., Bouvier, T. Fouilland E. Leboulanger C. Confurius-Guns, V. et al. (2015). Competition and facilitation between the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* and its associated bacterial community. *Frontiers in Microbiology* 5:795.
- Brookes, J.D., Regel, R.H. and Ganf, G.G. (2003) 'Changes in the photochemistry of

Buddemeier RW, Baker AC, Fautin DG & Jacobs JR (2004). The adaptive hypothesis of bleaching. *Coral Health and Disease* (Rosenberg E & Loya Y, Eds), pp. 427–444. Springer-Verlag, Berlin.

Chorus I, Bartram J (Eds) (1999). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, on behalf of the World Health Organisation

Dini-Andreote F, Pylro VS, Baldrian P, van Elsas JD, Salles JF. (2016). Ecological succession reveals potential signatures of marine-terrestrial transition in salt marsh fungal communities. *The ISME Journal*.

Dziallas, C., and Grossart, H. P. (2011). Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environmental Microbiology*. 13: 1632–1641.

Easson CG, Thacker RW (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology*. 5(532)

Eiler, A., and Bertilsson, S. (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* 6: 1228– 1243

Farnelid, H, Tarangkoon W, Hansen G, Hansen PJ, Riemann L. (2010). Putative N₂-fixing heterotrophic bacteria associated with dinoflagellate-Cyanobacteria consortia in the low-nitrogen Indian Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*. 61: 105-117.

Fitzsimons AG, Smith RV. (2007). The isolation and growth of axenic cultures of planktonic blue-green algae. *British Phycological Journal*. 19(2): 157-162.

Garcia-Pichel, F, Pringault O. (2001) Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* 413: 380–381.

Genuário DB, Corrêa DM, Komarek J, Fiore MF. (2013). Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* (Cyanobacteria) isolates from Antarctica. *Journal of Phycology*. (49): 1142-1153.

Gerphagnon M, Macarthur DJ, Latour D, Gachon CMM, Ogtrop FV, Gleason FH, Sime-Ngando T. (2015). Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.12860

Gilbert GS, Webb CO. (2007). Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 104(12): 4979-4983.

Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T (2005) Marine diatom species harbor distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* 7: 860–873

Hoff-Rissetti C, Dörr, FA, Schaker PDC, Pinto E, Werner VR, Fiore MF. (2013). *Cylindrospermopsin* and *saxitoxin* synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PLoS ONE* 8:e74238.

Humbert J F, Dorigo U, Cecchi P, Le Berre B, Debroas D, and Bouvy M. (2009). Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environmental Microbiology*. 11: 2339–2350.

Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP and Webb C O. (2010). Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463–1464.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kinkel LL, Bakker MG, and Schlatter DC. (2011) A coevolutionary framework for managing disease- suppressive soils. *Annuals Reviews in Phytopathology* 49: 47–67.

Kirkwood AE, Nalewajko C, and Fulthorpe RR. (2006). The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants. *Microbial Ecology* 51: 4–12.

Kolmonen E; Sivonen K J, Rapala J, Hauka K. (2004). Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacterial in cyanobacterial blooms in lake Joutikas Finland. *Aquatic Microbial Ecology*. 36: 201-211.

Komárek J, Nedbalová L, Hauer T. (2012). Phylogenetic position and taxonomy of three heterocystous cyanobacteria dominating the littoral of deglaciated lakes, James Ross Island, Antarctica. *Polar Biology*. 35: 759-774.

Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, and Teplitski M. (2013). Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings in Biological Science*. 280, 20122328–20122328.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). Genuário DB, Corrêa DM, Komárek J, Fiore MF. (2013), Characterization of freshwater benthic biofilm-Forming Hydrocoryne (Cyanobacteria) isolates from Antarctica. *Journal of Phycology*. 49: 1142-1153.

Leloup, M., Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., and Feuillade-Cathalifaud, G. (2013). Organic matter produced by algae and cyanobacteria: quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Science*. 25: 1089–1097.

Louati, I., Pascault, N., Debroas, D., Bernard, C., Humbert, J. F., and Leloup, J. (2015). Structural diversity of bacterial communities associated with bloom- forming freshwater cyanobacteria differ according to the cyanobacterial genus. *PLoS ONE*. 10(11): e0140614.

Maruyama T, Kato K, Yokoyama A, Tanaka T, Hiraish. A, Park, HD. (2003); Dynamics of Microcystin- Degrading bacteria in Mucilage of *Microcystis*. *Microbial Ecology*. 46: 279-288.

Maruyama THD, Park K, Ozawa Y, Tanaka T, Sumino K, Hamana A, Hirashi and K. Kato (2006): *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin degrading bacterium. *Int. J. Systematic and Evolutive Microbiology*, 56, 85–89.

Maruyama, T., Kato, K., and Park, H. D. (2004). Population dynamics of free- living bacteria related to the microcystin-degrading strain Y2 in Lake Suwa and in microcystin amended enrichments. *Microbes and Environment*. 19: 137–146.

- Mitrovic, S.M., Howden, C.G., Bowling, L.C. and Buckney, R.T. (2003) "Unusual allometry between in situ growth of freshwater phytoplankton under static and fluctuating light environments: possible implications for dominance". *Journal of Plankton Research*. 25(5): 517-526.
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Guilio, A., and Gambacorta, A. (1999) Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non- heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52: 639– 647.
- Paerl HW. (1996), A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia*. 35(6): 25-35.
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, Humbert JF. (2013). Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environmental Microbiology*. 5: 716–24.
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, et al. (2013). Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free– living communities living in the same ecosystem. *Environmental Microbiology. Reports*. 5: 716–724.
- Pedrós-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*. 14: 257–263.
- Ploug, H., Adam, B., Musat, N., Kalvelage, T., Lavik, G., Wolf-Gladrow, D., et al. (2011). Carbon, nitrogen and O₂ fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *The ISME Journal*. 5: 1549–1558.
- Provorov, NA., and Vorobyov, NI. (2009) Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses. *Phytochemistry Reviews* 8: 519–534.
- Radwan, SS, Al-Hasan, RH, Salamah, S, Al-Dabbous, S. (2002) Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50: 55–59.
- Rigonato J, Alvarenga DO, Andreote FD, Dias AFC, et al., (2012). Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbial Ecology*. 80: 312-322.
- Sánchez O, Diestra E, Esteve I, Mas J. (2005). Molecular characterization of an Oil-Degrading Cyanobacterial consortium. *Microbial ecology*.
- Sanchez-Baracaldo P, Hayes, PK., Blank, CE. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*, 3(145) - 165. 2005. 50: 580-588.
- Schirrmeister BE, De Vos JM; Antonelli A; Bagheri H. (2013). Evolution of multicellularity coincided with the increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *PNAS*. 110(5): 1791-1796.
- Schirrmeister BE; Antonelli A; Bagheri H. (2011). The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology*. 11(45).

- Schopf JM, Walter MR. (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence. In: Carr NG, Whitton BA (Eds). *The Biology of Cyanobacteria*, 543-564, Blackwell, Oxford, University of California Press, Berkeley
- Shen, H., Niu, Y., Xie, P., Tao, M., and Yang, X. (2011). Morphological and physiological changes in *Microcystis* spp. as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*. 56: 1065–1080.
- Shi, L., Cai, Y., Kong, F., and Yu, Y. (2012). Specific association between bacteria and buoyant *Microcystis* colonies compared with other bulk bacterial communities in the eutrophic Lake Taihu, China. *Environment. Microbiology. Reports*. 4: 669–678.
- Shilo, M. (1980) Strategies of Adaptation to Extreme Conditions in Aquatic Microorganisms. *Naturwissenschaften*. 67: 384-389.
- Sison-Magnus. MP; Jiang S; Tran KN; Kudela RM. (2014). Host-specific adaptation governs the interaction of the marine diatom, *Pseudo-nitzschia* and their microbiota. *The ISME journal*. (8). 63-76.
- Sweet MJ, Bulling MT. (2017). On the importance of the Microbiome and Path biome in coral health and Disease. *Frontiers in Marine Science*. 4(9): 1-11.
- Thrall PH, Burdon JJ. (2003). Evolution of virulence in plant host-pathogen metapopulation. *Science*. 299:1735-1737.
- Van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Kristufek V, Salles JF. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings in National Academy of Science*. 109: 1159–1164.
- Whitton, B A, Potts M. Introduction to cyanobacteria. In Whitton, B A, Potts M. (2000) (Ed.). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht; Kluwer Academic.
- Worm J, Sondergaard M. (1998). Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology*. 14: 19-28.
- Worm J, Sondergaard M. (1998). Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* sp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology*. (14): 19-28.
- Zhu L, Zancarini A, Louati I, De Cesare S, Duval C, Tambosco K, Bernard C, Debroas D, Song L, Leloup J, Humbert J –F. (2016). Bacterial Communities Associated with Four Cyanobacterial Genera Display Structural and Functional Differences: Evidence from an Experimental Approach. *Frontiers of Microbiology*. 7:1662.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo elucidou, dois panoramas distintos de associação microrganismos – hospedeiros, com o intuito de elucidar que apesar das dissimilaridades entre os hospedeiros e serem organismos alocados em Domínios da vida distintos, existem similaridades entre os padrões de associação ou fatores que determinam a associação desses seres com a comunidade bacteriana.

Ao avaliar o efeito do endemismo das plantas em sua comunidade bacteriana associada podemos observar que as características fenotípicas dessas plantas desempenham papel crucial na seleção de microrganismos para compor sua microbiota. Pode-se também sugerir que o isolamento geográfico e as condições de restrição das ilhas que dirigiram a especiação das plantas podem ter influenciado a estrutura e composição de sua comunidade bacteriana. Além disso, o principal grupo associado à essas plantas endêmicas foi Proteobacteria, mais especificamente Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria.

De maneira similar ao observado nas plantas endêmicas, as comunidades bacterianas hospedadas pelas cianobactérias são influenciadas diretamente por suas características filogenéticas e fenotípicas. Assim como em relações estabelecidas entre microrganismos e organismos superiores, foi possível observar que ao ocorrerem modificações na fisiologia do hospedeiro em decorrência de modificações no ambiente, o microbioma associado responde a essa variação e que essa resposta é essencial para o desenvolvimento e a adaptação das cianobactérias a essa nova condição. Os principais grupos associados são Betaproteobacteria, Flavobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, OPB56 e Opitutae.

De forma geral, pode-se considerar que tanto as plantas quanto as cianobactérias seguem padrões semelhantes no estabelecimento de suas associações com a comunidade bacteriana. Ambos os hospedeiros são capazes de interagir com uma vasta gama de bactérias, visto os elevados índices de diversidade apresentados, e que dentro dessa diversidade, alguns grupos são preferencialmente encontrados (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria e Flavobacteria. Além disso, observou-se que o microbioma associado

a esses hospedeiros é espécie/gênero específico e que essa interação é vital para a sobrevivência de ambos frente as variações ambientais.