



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

EMANUELLE FONTENELE RABELO

DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
ZOANTÍDEOS (CNIDARIA, ZOANTHIDAE)

FORTALEZA
2012

EMANUELLE FONTENELE RABELO

**DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
ZOANTÍDEOS (CNIDARIA, ZOANTHIDAE)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Matthews-Cascon

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

R114d Rabelo, Emanuelle Fontenele

Diversidade de micro-organismos associados à zoantídeos (CNIDARIA, ZOANTHIDAE) / Emanuelle Fontenele Rabelo. – 2012.

180 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Utilização e manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

Orientação: Prof^ª. Dr^ª Helena Matthews Cascon.

1. Cnidaria. 2. Recifes e ilhas de coral. 3. Bacterias. I. Título.

CDD 593.5

EMANUELLE FONTENELE RABELO

**DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
ZOANTÍDEOS (CNIDARIA, ZOANTHIDAE)**

Tese apresentada ao curso de doutorado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Matthews-Cascon (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cristiane Francisca da Costa
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dra. Krystyna Gorlach-Lira
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dr. Fabiano Lopes Thompson
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Ao mar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao mar, pela paz que ele traz e por ter permitido a sobrevivência dos apaixonantes zoantídeos, para os quais dediquei tantos anos de estudo.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, profa. Helena Matthews-Cascon, por todo o ensinamento, paciência e paz que transmite. Devo minha formação e a paixão ao que faço a essa mulher, pequena em tamanho, mas gigante em conhecimento e coração.

À profa. Vânia Maria Maciel Melo por ter me aceito em seu laboratório ainda sem uma ideia definida do que fazer e sem ter noção do desafio que ia encontrar pela frente encarando o caminho rumo à biologia molecular. Tenho uma enorme admiração por esse exemplo de orientadora, professora e pesquisadora. Agradeço pela confiança e aprendizado. Minha iniciante carreira de orientadora tem muitos de seus ensinamentos.

Ao prof. Tito Lotufo, pelas valiosas contribuições ao longo de minha jornada sempre me fazendo refletir sobre meus erros, tentando sempre melhorar. Obrigada por aceitar estar novamente avaliando meu crescimento.

À grande amiga e colega de trabalho Raphaela Vasconcelos pela convivência em momentos de adaptação em terras potiguares, pelo carinho e pela grande ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Lembiotech, que me apoiaram em todas as etapas do meu trabalho, sempre ajudando a decifrar os mistérios das PCRs que não funcionavam, em especial Elis, Tati, Lidiane, Vanessas (Jr. e Sênior), Bárbara, Natália, Alysson, Geórgia, Leo, Tallita, Denise e Wal. Obrigada a todos!

As profas. Cristiane Costa e Krystyna Gorlach-Lira por compartilharem comigo as dificuldades do estudo de micro-organismos associados a corais e por terem me aceitado em seu laboratório para que pudesse aprender um pouco sobre o que me fez especialista hoje. Não esquecerei nunca do grande exemplo dado pela profa. Krystyna, que dedica agora sua pesquisa ao Brasil e aceitou adotar nosso país como casa.

Ao meu namorado Rafael Yabe, que entrou na minha vida em um momento em que minhas atenções estavam voltadas para a tese e mesmo assim aceitou ser trocado em alguns momentos. Obrigada pelo apoio, carinho, força e acima de tudo, por fazer parte da minha vida.

À minha família, em particular minhas irmãs e meus pais, por terem acompanhado de longe essa minha rotina de idas e vindas, me apoiando e fazendo sempre a mesma pergunta: “Mas o que é mesmo que você faz nesse seu doutorado?”

Às minhas grandes amigas que são meu porto seguro além-fronteiras CE-RN: Janisi Sales, Cristina Baldauf e Eveline Ferreira.

À UFERSA, minha segunda casa e aos amigos conquistados lá, minha segunda família;

À querida amiga Inês Xavier pelo companheirismo e amizade e por ter sido responsável por um grande passo na minha vida profissional e pessoal.

Ao prof. Rodrigo Fernandes pela ajuda na redação dos resultados.

Aos sempre incontáveis colegas de Laboratório de Invertebrados Marinhos pela amizade, em especial Soraya Rabay e Cristiane Xerez pelas conversas descontraídas e desabafos.

E, por fim, um agradecimento especial aos meus orientadores invisíveis, por sempre me ajudarem em momentos de difíceis decisões.

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Recifes de corais são ecossistemas de grande diversidade biológica e de extrema relevância ecológica. Alguns animais que compõem os recifes de coral apresentam uma associação dinâmica entre o animal hospedeiro e uma diversidade de micro-organismos associados. De maneira geral, esses micro-organismos estão envolvidos na fisiologia do hospedeiro, gerando benefícios como a troca de nutrientes e produção de compostos bioativos utilizados na defesa contra predação e competição por espaço. O conhecimento limitado sobre a diversidade de simbiontes de zoantídeos e a hipótese de que eles estão envolvidos em estratégias competitivas do hospedeiro e na resistência a fatores adversos justificam a relevância deste estudo. Nesse contexto, esse estudo teve por objetivo estudar a diversidade e estrutura da comunidade de bactérias e zooxantelas associadas aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* e *Protopalythoa variabilis*, encontrados no nordeste do Brasil. Para tal, amostras dos tecidos dos zoantídeos e da água do mar foram utilizadas para extração de DNA e amplificação dos genes ribossomais. A estrutura das comunidades foi analisada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e a diversidade taxonômica por bibliotecas genômicas. Os resultados demonstraram perfis microbianos altamente diversificados e a microbiota parece ser espécie-específica. De acordo com as bibliotecas de rDNA 16S, os principais filos associados aos corais foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. A classe Gammaproteobacteria foi dominante em *P. caribaeorum*, enquanto representantes da classe Alphaproteobacteria foram majoritariamente encontrados na água do mar e nos zoantídeos *Z. sociatus* e *P. variabilis*. Essas duas espécies de zoantídeo também apresentaram as maiores diversidades de bactérias simbiontes. A maioria das bactérias identificadas foi relacionada com a produção de compostos bioativos, o que sugere um papel de defesa para o hospedeiro. A presença de grupos específicos de bactérias nos zoantídeos sugere aquisição por transferência vertical. O estudo da diversidade de zooxantelas indicou a ocorrência dos clados A, e C de *Symbiodinium* nas três espécies de zoantídeos. O clado A foi identificado apenas em *Z. sociatus*, enquanto o clado C foi identificado nas três espécies. Os clados A e C são reconhecidamente relacionados à resistência contra o branqueamento. Estes dados indicam que a diversidade de simbiontes é alta e deve ser considerada sob o ponto de vista da conservação de ambientes marinhos.

Palavras-chave: Simbiose, zoantídeos, bactérias, zooxantelas, recifes de coral.

ABSTRACT

Coral reefs are ecosystems of great biological diversity and ecological relevance. Some animals on coral reefs have a dynamic association between the animal host and a diversity of associated micro-organisms. These micro-organisms are directly involved on their fisiology, generating benefits as the exchange of nutrients and production of bioactive compounds used in defense against predation and competition for space. The importance of coral–microbial interactions is increasingly being recognized, with studies demonstrating the active role that the associated microbial communities play in maintaining coral health and resilience. The limited knowledge on the diversity of zoanths' symbionts and the hypothesis that symbiotic micro-organisms are involved in competitive strategies of defense to adverse factors justify the relevance of this study, which aimed to access the diversity and community structure of bactéria and zooxanthellae associated with *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* and *Protopalythoa variabilis*, commonly found on the northeast coast of Brazil. The structure of the communities was assessed by denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) and 16S cloning library. Tissues from corals and seawater were collected and used for extraction and amplification of 16S or 28S rDNA genes by polymerase chain reaction. The results showed diverse microbial communitie associated with the zoanthid species and sea water. The microbiota appears to be species-specific. According to the 16S rDNA libraries, the phyla Proteobacteria, Bacteriodetes and Cyanobacteria were predominant. The class Gammaproteobacteria was characteristically found associated to *P. caribaeorum* whereas Alphaproteobacteria was dominant in *Z. sociatus* and *P. variabilis*, which were also the most diverse hosts. Most of the identified bactéria were related to bioactive compound production which can be benefic to the host. The presence of exclusive bacteria in the zoanths suggests that some species might be transmitted vertically to the host. The study of zooxanthellae diversity indicates the occurrence of the clades A and C of *Symbiodinium* in the studied zoanths. The clade A was identified only in *Z. sociatus* whereas the clade C was present in all studied zoanths. These clades are related to bleaching resistance and can confer more resistance to adverse environmental factors. This is the first study to examine the diversity and community structure of bactéria and zooxanthellae of Brazilian zoanths. These data indicate that symbiont diversity is high and must be considered regarding the conservation of marine habitats.

Key-words: Symbiosis, zoanths, bacteria, zooxanthellae, coral reef.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Distribuição mundial dos recifes de coral. Fonte: Institute for Marine Remote Sensing, University of South Florida.....19
- Figura 2: Habitats possíveis para os simbiontes. A parte superior da figura corresponde ao coral *Oculina patagônica*. Modificado de Rosenberg *et al.* (2007).....27
- Figura 3: Mapa de localização da área de estudo (Praia de Paracuru – Ceará, Nordeste do Brasil).....46
- Figura 4: Afloramentos rochosos que formam o recife de arenito da praia de Paracuru-Ce. As setas indicam as poças de maré que se formam durante a maré baixa.....47
- Figura 5: Colônias de zoantídeos em habitat natural (Praia de Paracuru – Ce). (A): *Zoanthus sociatus*, (B): *Protopalythoa variabilis* e (C): *Palythoa caribaeorum*.....49
- Figura 8: Estrutura das comunidades bacterianas associadas com os zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus*, *Protopalythoa variabilis* e água do mar revelados por DGGE. Setas destacam as bandas mais intensas de cada uma das amostras.....54
- Figura 9: Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas por DGGE para as amostras de zoantídeos e água do mar.....55
- Figura 10: Diagrama de Venn baseado nas UTOs únicas e compartilhadas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.....55
- Figura 11: Similaridade entre as amostras baseada no compartilhamento de UTOs revelada por DGGE.....56
- Figura 13: Abundância dos gêneros nas amostras de zoantídeos e água do mar. A: *Palythoa caribaeorum*, B: *Protopalythoa variabilis*; C: *Zoanthus sociatus*; D: Água do Mar. O símbolo * acima das barras indicam os gêneros exclusivos.....61
- Figura 14: Ordenação não métrica (NMDS) das amostras de zoantídeos e água do mar.....62
- Figura 15: Diagrama de Venn baseado nas UTOs únicas e compartilhadas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.....64
- Figura 16: Curvas de rarefação obtidas pelo MOTHUR para as bibliotecas de RNAr 16S de zoantídeos e água do mar.....64

- Figura 17: Prováveis formas de transmissão dos diferentes grupos bacterianos identificados nos zoantídeos. Os símbolos α , γ , β e δ representam as classes α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria, respectivamente.....80
- Figura 18: Arranjo do gene codificador para o Ribossomo de *Symbiodinium* Modificado de Wolfgang Seifarth (2002).....95
- Figura 19: Estrutura das comunidades de zooxantelas associadas aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus*, *Protospalythoa variabilis* e água do mar. Amostras em triplicata. As setas destacam as bandas mais intensas de cada uma das amostras.....102
- Figura 20: Riqueza de UTOs para as amostras de zoantídeos e água do mar..... 103
- Figura 21: Diagrama de Venn baseado nas UTOs compartilhadas e únicas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.....103
- Figura 22: Similaridade entre as amostras baseada na composição de UTOs de *Symbiodinium* revelada por DGGE.....104
- Figura 23: Diversidade de zooxantelas para as espécies de zoantídeos.....105
- Figura 24: Curvas de rarefação obtidas pelo MOTHUR para o gene ITS de Zooxantelas associadas aos zoantídeos. P: *Palythoa caribaeorum*, Z: *Zoanthus sociatus*, V: *Protospalythoa variabilis*.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de clones, UTOs e riqueza das bactérias associadas as amostras de zoantídeos a água do mar.....	57
Tabela 2: Táxons bacterianos identificados em <i>Palythoa caribaeorum</i> . O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.....	59
Tabela 3: Táxons bacterianos identificados em <i>Zoanthus sociatus</i> . O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.....	59
Tabela 4: : Táxons bacterianos identificados em <i>Protopalythoa variabilis</i> . O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.....	60
Tabela 5: Táxons bacterianos identificados na água do mar. O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.....	60
Tabela 6: Riqueza, Equabilidade e índices de diversidade dos gêneros bacterianos associados aos zoantídeos e água do mar.....	61
Tabela 7: Índices de Jaccard (matriz triangular inferior) e Morisita-Horn (matriz triangular superior) calculados para as amostras de zoantídeos e água do mar.....	63
Tabela 8: Numero de clones e riqueza de UTOs de <i>Symbiodinium</i> para cada zontáideo.....	104
Tabela 9: Comparação estatística (valores de P) entre as amostras em relação à composição das sequências de <i>Symbiodinium</i> presentes nos zoantídeos.....	105
Tabela 10: Índices de diversidade entre as amostras baseado na diversidade das sequências do gene ITS.....	106

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATGE	Agar Triptona Glicose Extrato de levedura
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTAB	Brometo de Cetiltrimetiâmonio
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetrácetico
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
ITS	Espaçador transcrito interno
KCl	Cloreto de Potássio
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar, UFC
LB	Luria – Bertani
MEGAN	Metagenome Analyser
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NMDS	Escalonamento Multidimensional Não Métrico
PCR	Reação Em Cadeia da Polimerase
RDP	Ribossomal Database Project
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
UTO	Unidade Taxonômica operacional

X-gal	Bromo-cloro-indolil-galactopiranosídeo
μL	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
1. Os ambientes recifais.....	19
2. Características do filo Cnidaria.....	21
2.1 Ecologia.....	21
2.2 Taxonomia e Sistemática dos zoantídeos da costa cearense.....	23
3. A Simbiose entre cnidários e micro-organismos.....	26
4. Corais x Impactos antrópicos.....	28
CAPÍTULO I: Bactérias Associadas a Zoantídeos.....	35
1. Introdução	36
1.1 Funções biológicas e adaptações biológicas entre cnidários e bactérias simbiotes.....	38
1.2 Métodos moleculares aplicados ao estudo da simbiose entre corais e bactérias.....	41
2. Objetivos.....	45
2.1 Objetivo geral.....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3. Material e Métodos.....	46
3.1 Área de Coleta.....	46
3.2 Coleta e armazenamento das amostras.....	47
3.3 Extração de DNA total.....	49
3.4 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	50
3.5 Construção de bibliotecas do gene 16S RNAr.....	51
3.5.1 Amplificação do gene 16S RNA.....	51
3.5.2 Ligação, transformação e clonagem	51
3.5.3 Sequenciamento.....	52
3.6 Análise dos dados.....	52
3.6.1 Análise do gel de DGGE.....	52
3.6.2 Análise das bibliotecas do gene 16S RNAr.....	52
4. Resultados	54
4.1 Estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos.....	54
4.2 Diversidade das comunidades bacterianas através da análise da biblioteca do gene 16S RNAr.....	56
5. Discussão.....	66
5.1 Diversidade e papel biológico das bactérias associadas aos zoantídeos.....	66
5.2 Mas de onde os zoantídeos adquiriram as bactérias simbiotes?.....	76
6. Conclusões.....	82

CAPÍTULO II: Zooxantelas Associadas a Zoantídeos.....	83
1. Introdução	83
1.1 Diversidade e distribuição das zooxantelas.....	85
1.2 Funções biológicas e adaptações fisiológicas entre cnidários e zooxantelas.....	86
1.3 Métodos moleculares aplicados ao estudo da simbiose entre corais e zooxantelas.....	95
2. Objetivos.....	99
2.1 Objetivo geral.....	99
2.2 Objetivos específicos.....	99
3. Material e Métodos.....	100
3.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	100
3.2 Construção de bibliotecas do gene ITS.....	100
3.2.1 Amplificação da região ITS.....	100
3.2.2 Ligação, transformação, clonagem e sequenciamento do gene ITS.....	101
3.3 Análise dos dados.....	101
3.3.1 Análise do gel de DGGE.....	101
3.3.2 Análise das bibliotecas do gene ITS.....	101
4. Resultados.....	102
4.1 Estrutura da comunidade de zooxantelas associadas aos zoantídeos.....	102
4.2 Diversidade de <i>Symbiodinium</i> através da análise das bibliotecas do gene ITS.....	104
5. Discussão.....	107
5.1 Diversidade e papel biológico das zooxantelas associadas aos zoantídeos.....	107
5.2 Mas de onde os zoantídeos adquiriram as zooxantelas simbiotes?.....	114
6. Conclusões.....	116
7. Considerações Finais.....	117
8. Referências Bibliográficas.....	118
APÊNDICE.....	138

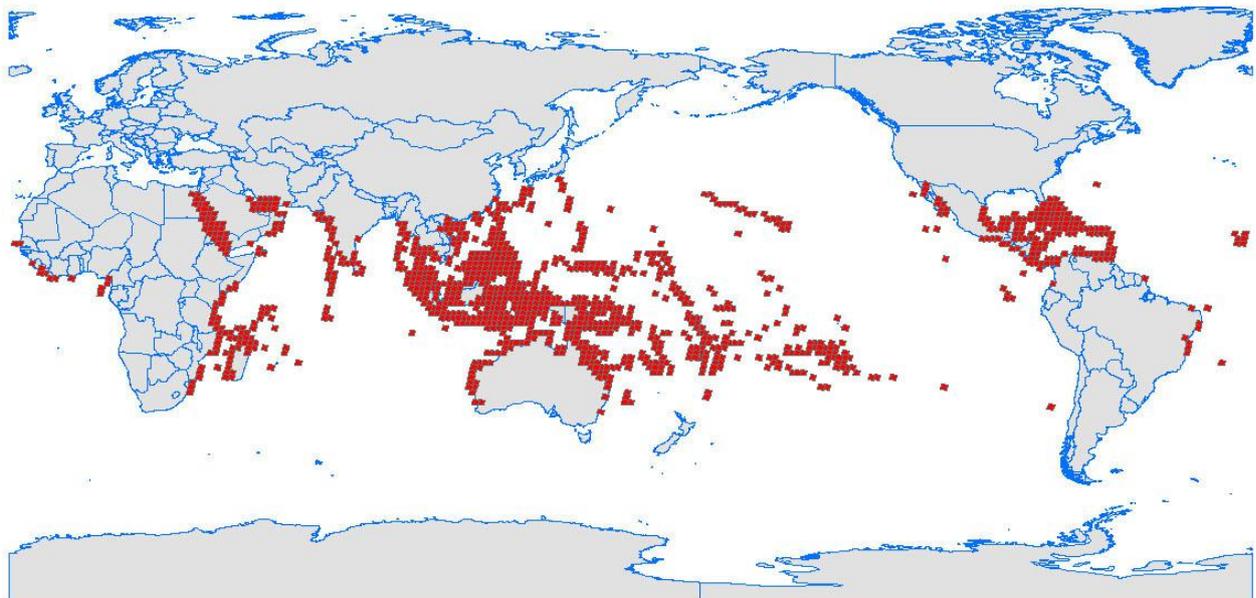
INTRODUÇÃO GERAL

1. Os Ambientes Recifais

Os recifes de corais são um dos ecossistemas mais espetaculares e complexos do mundo e são caracterizados pela mais alta densidade de animais de todos os ambientes do planeta, além de apresentarem uma diversidade comparável àquela encontrada em florestas tropicais (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001).

Os ambientes recifais correspondem a cerca de 15% do fundo marinho entre 0 e 30 metros de profundidade, cobrindo cerca de 0,2% da área oceânica mundial, o equivalente a aproximadamente 600.000 Km² (VILLAÇA, 2002)(Figura 01).

Figura 1: Distribuição mundial dos recifes de coral. Fonte: Institute for Marine Remote Sensing, University of South Florida.



De acordo com Spalding; Revilious; Green (2001) Charles Darwin foi provavelmente o primeiro a preparar um mapa global dos recifes de coral e comentaram que esses ambientes são restritos a regiões tropicais, circulando a maior parte do globo, embora não sejam uniformemente distribuídos. Ainda de acordo com esses autores, a maioria dos recifes de coral é encontrada no Indo-Pacífico e menos de 8% deles são encontrados no Caribe e no Atlântico.

Pode-se destacar a importância dos recifes sob os aspectos físico – como barreiras de proteção de regiões costeiras contra a ação do mar; biológico – devido à grande riqueza e

abundância de organismos associados; e bioquímico – como fontes de matérias-primas para fins farmacológicos (MMA, 2003). Além disso, esses ambientes marinhos consolidados são geralmente caracterizados por uma alta complexidade de substratos, importantes principalmente para organismos sésseis (DENOVARO; FRASCHETTI, 2002). Segundo Spalding; Ravilious; Green (2001), os recifes de coral oferecem uma série de nichos ecológicos, talvez mais do que qualquer outro bioma. A grande complexidade de habitats proporciona um ambiente ideal para inúmeras espécies de invertebrados dos quais muitos peixes se alimentam, além de ser uma área de berçário e abrigo, apresentando uma complexa cadeia alimentar e um fluxo constante entre os diversos níveis tróficos.

Os recifes de coral brasileiros estão limitados à região Nordeste, com extensão de 3000 km do Maranhão até o sul da Bahia (LABOREL, 1969; LEÃO, 1986), sendo as formações do litoral sul do estado da Bahia as maiores e mais ricas do Brasil e de todo o Atlântico Sul Ocidental (LEÃO, 1994). Contudo, nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, e Alagoas também há bancos recifais de formatos e dimensões variadas (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000).

No nordeste do Brasil destacam-se também os recifes de arenito, formados por afloramentos rochosos decorrentes de um processo de calcificação de sedimentos *in situ*. Esses recifes desempenham um papel de fundação sobre os quais podem se desenvolver um recife coralino. No Brasil aparecem principalmente na região entre o Cabo de São Roque e a desembocadura do Rio São Francisco, com algumas formações nos litorais do Ceará, Bahia e do Espírito Santo (VILLAÇA, 2002).

No Estado do Ceará há amplas formações de recifes de arenito que interrompem a faixa arenosa, predominantemente na região entre marés, possuindo formato tabular, ligeiramente inclinado em direção ao mar e são formados por areia cimentada por carbonato de cálcio e óxido de ferro (MORAIS, 1967).

O ambiente de recifes de arenito é caracterizado pelo aparecimento de poças de maré facilmente acessíveis durante a maré baixa e geralmente abrigam uma fauna mais rica do que praias arenosas, pois os animais conseguem tolerar o hidrodinamismo das ondas fixando-se firmemente a um substrato estável (MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006).

Dentre os principais organismos presentes em ambientes recifais estão macroalgas, esponjas, cnidários, poliquetas, nemertíneos, planárias, crustáceos, moluscos, briozoários,

equinodermos, ascídias, peixes, répteis, aves e mamíferos marinhos (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001)

Embora apresentem uma grande diversidade de organismos de diferentes grupos, os principais organismos bioconstrutores de recifes de coral são os invertebrados do Filo Cnidaria, particularmente os pertencentes à classe Anthozoa e Hydrozoa.

2. Características do Filo Cnidaria

2.1 Ecologia

O filo Cnidaria é um conjunto bastante diverso que inclui as águas-vivas, anêmonas-do-mar, corais, hidrozoários, gorgônias, etc., compreendendo cerca de 11.000 espécies existentes separadas em quatro classes: Hydrozoa, Anthozoa, Scyphozoa e Cubozoa (BRUSCA; BRUSCA, 2007). São animais relativamente simples, com apenas dois epitélios (epiderme e gastroderme) separados por uma camada denominada mesoglêia. Possuem apenas uma cavidade corpórea denominada cavidade gastrovascular com uma abertura para o ambiente, a boca. Os cnidários são em sua grande maioria marinhos, com exceção das hidras e de alguns poucos hidrozoários dulcícolas. A maioria habita águas rasas e as formas sésseis são abundantes nas costas rochosas ou nas formações coralinas de águas tropicais (RUPPERT; FOX; BARNES, 2003).

A presença de cnidas é característica exclusiva do filo Cnidaria sendo tais estruturas produzidas em células especializadas denominadas cnidócitos que apresentam diferentes funções de acordo com o tipo de cnida (espirocistos, nematocistos e pticocistos), sendo os nematocistos o tipo mais conhecido devido sua ação urticante. Os cnidócitos têm diferentes funções e muitos possuem potentes toxinas que são injetadas na presa ou no agressor através de filamentos ejetáveis em decorrência de um estímulo químico ou mecânico (BRUSCA; BRUSCA, 2007; RUPPERT; FOX; BARNES, 2003).

Os cnidários bentônicos são de grande importância ecológica nos ambientes recifais por apresentarem associações com uma variedade de invertebrados, além disso, os ambientes de substratos consolidados contruídos por esses animais provêm maior estabilidade e proteção para muitos indivíduos sésseis (BAYER, 1961).

Os corais (filo Cnidaria, classe Anthozoa) são organismos muito simples normalmente apresentando um corpo cilíndrico com um anel de tentáculos circundando a boca, os quais são usados na captura de alimento. Além disso, um grande número de corais desenvolve a capacidade de formar colônias e construir um exoesqueleto de carbonato de cálcio na sua base, com colônias em formato de cúpula ou formando ramificações. Esses corais são conhecidos como escleractínios. De acordo com esses autores, mesmo em condições ideais os corais escleractínios apresentam crescimento muito lento, com taxas de apenas alguns milímetros por ano. Mesmo os corais de crescimento mais rápido (os que foram ramificações) crescem a uma taxa de apenas 150 milímetros por ano.

Os corais normalmente apresentam em seus tecidos dinoflagelados fotossintetizantes simbiotes, conhecidos como zooxantelas, que estão intimamente envolvidos na fisiologia do hospedeiro (BAKER, 2003). Schuhmacher e Zibrowius (1985) caracterizaram dois tipos de corais de acordo com a presença ou ausência de zooxantelas simbiotes: corais zooxantelados e azooxantelados, respectivamente.

Os corais zooxantelados prosperam em águas tropicais claras e pobres em nutrientes (LEÃO, 1986). A temperatura da água deve ser na faixa entre 16° C e 36 °C, sendo o ótimo entre 23° C e 25 °C, além disso, a turbidez deve ser baixa devido à necessidade de luz para a fotossíntese das zooxantelas, necessárias à vida da maioria dos corais e que participam ativamente na formação dos recifes (COUTINHO, 2002; SMITH, 1971).

No Brasil a fauna de corais é caracterizada por uma baixa diversidade de espécies e um elevado grau de endemismo. Apenas 19 espécies de corais escleractínios são conhecidas, das quais pelo menos seis (incluindo todas as espécies do gênero *Mussismilia*) são endêmicas (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001).

Na costa cearense predominam os corais zooxantelados conhecidos como corais moles ou zoantídeos. Esses organismos têm essa denominação devido ao fato de não apresentarem deposição de carbonato de cálcio em sua base. Zoantídeos são invertebrados comumente encontrados em todos os oceanos do mundo, geralmente formando grandes colônias incrustadas sobre as formações recifais da faixa entre marés (SEBENS, 1982). Na costa cearense os zoantídeos formam densas colônias sobre o substrato rochoso de recifes de arenito onde competem por espaço (RABELO, 2007).

A presença de espécies de corais construtores de recifes na costa cearense é pouco significativa, ocorrendo como colônias isoladas ou agregadas, formando manchas ou sítios.

Apesar disso, o seu papel no ecossistema local é bastante semelhante ao que desempenham quando formam recifes, pelo menos ao atuarem como “produtores primários”, devido às zooxantelas, como fonte de alimento para animais especializados na sua predação ou como substrato e abrigo para uma fauna de comensais, perfurantes e oportunistas dos mais variados grupos (KAPLAN, 1988).

Os zoantídeos são organismos sésseis abundantes nas regiões tropicais, particularmente em formações recifais. Esses organismos ficam sujeitos à subida e à descida da maré podendo permanecer por muitas horas emersos (MUIRHEAD; RYLAND, 1985). Os cnidários pertencentes a esta família são componentes bastante difundidos e geralmente abundantes em comunidades marinhas de ecossistemas tropicais, mas, apesar de sua importância, seu conhecimento ainda permanece restrito (BABCOCK; RYLAND, 1990). Zoantídeos reproduzem-se de maneira assexuada, por fragmentação dos pólipos e por reprodução sexuada com fertilização externa (BOSCOLO; SILVEIRA, 2005; FADLALLAH, KARLSON; SEBENS, 1984; KARLSON, 1983).

2.2 Taxonomia e Sistemática dos Zoantídeos da Costa Cearense.

No estado do Ceará são encontradas três espécies de zoantídeos, que seguem a seguinte classificação taxonômica:

Cnidaria Verrill, 1865

Anthozoa Ehrenberg, 1833

Hexacorallia

Zoanthidea (HYMAN 1940)

Brachycnemina Haddon e Shackleton, 1891

Zoanthidae Gray, 1840

Palythoa Lamouroux, 1816

Palythoa caribaeorum (DUCHASSAING; MICHELOTTI, 1860)

Protopalythoa Verril, 1900

Protopalythoa variabilis (DUERDEN, 1898);

Zoanthus Lamarck, 1801

Zoanthus sociatus Ellis, 1767

A ordem Zoanthidea (também reconhecida como Zoantharia por alguns autores) é a terceira maior ordem de Hexacorallia e é caracterizada por formas coloniais com duas coroas de tentáculos e um sifonoglifo (SINNIGER *et al.*, 2005). A ordem Zoanthidea é caracterizada por uma tendência a formar colônias de pólipos e um arranjo distinto de septos radiais internos. Os septos são pareados, cada par geralmente com um septo perfeito ou completo e um imperfeito ou incompleto (RYLAND; LANCASTER, 2003).

A sistemática corrente da ordem Zoanthidea é baseada na organização dos septos e segue a divisão do grupo em duas subordens: Brachycnemina e Macrocnemina, cada uma formada por muitos gêneros e espécies pobremente definidas. Essas subordens diferem pelo quinto par de septos o qual é completo em Macrocnemina e incompleto em Brachycnemina. Essa separação entre duas subordens também tem sido confirmada por características da reprodução sexuada. Brachycnemina produz larvas planctônicas, enquanto que larvas não planctônicas têm sido observadas em indivíduos da subordem Macrocnemina. Brachycnemina são zooxantelados e têm, assim como corais escleractínios, uma distribuição essencialmente tropical e em zona sublitoral rasas de recifes de coral. Macrocnemina tende a ocorrer em regiões fundas e comumente com ausência de zooxantelas (RYLAND; LANCASTER, 2003). Segundo Sinniger *et al.* (2005), Brachycnemina parece ser um grupo monofilético, enquanto Macrocnemina aparece como grupo parafilético.

A identificação de espécies de zoantídeos tem mostrado algumas dificuldades devido a diferentes critérios taxonômicos usado pelos autores. Muirhead e Ryland (1985) e Ryland e Lancaster (2003) propõem o uso dos nematocistos para a identificação das espécies. Já Sinniger *et al.* (2005) usam genes mitocondriais como um critério alternativo para a identificação taxonômica. Nos últimos anos, houve certa confusão no que se diz respeito aos gêneros *Palythoa* e *Protopalythoa*, os quais eram unidos em um só gênero: *Palythoa*. Entretanto, Ryland e Lancaster (2003) afirmaram que *Palythoa* e *Protopalythoa* constituem gêneros separados.

Segue uma breve diagnose das três espécies encontradas na costa cearense (segundo SEBENS, 1982 e ROHLFS; BELÉM, 1994) as quais são objeto da presente pesquisa:

***Palythoa caribaeorum* (DUCHASSAING; MICHELOTTI, 1860)**

Apresentam pólipos marrom-claros externamente e verde-brilhante na face interna do disco oral. *P. caribaeorum* desenvolve colônias com as paredes dos pólipos unidas por um cenênquima comum ao longo do seu comprimento, formando uma cobertura contínua sobre o substrato. As colônias podem ser removidas do substrato como pedaços intactos. A espessura da colônia é variável (entre 5-30 mm ou mais) assim como o diâmetro do pólipo (6-10mm na região do disco oral). O tamanho do pólipo é geralmente uma característica da colônia e pode ser relacionado ao habitat. *P. caribaeorum* é comum na zona entre marés rasa e na região sublitoral. *P. caribaeorum* alimenta-se ativamente de zooplâncton, primariamente na escuridão, quando há a expansão da cavidade pré-oral. Zooxantelas contribuem substancialmente na nutrição dessa espécie.

A identificação de espécies incrustantes de *Palythoa* é difícil e o grupo não tem sido revisado usando métodos modernos de taxonomia. É possível que *P. caribaeorum* seja sinônima de *P. mamillosa*.

***Protopythoa variabilis* (DUERDEN, 1898)**

Apresentam pólipos largos (8-14 mm de diâmetro oral, 15-40 mm ou mais de comprimento) com extensa abertura do disco oral. A coluna estreita em direção à base e as junções entre os pólipos são estolões filamentosos dos quais os pólipos são facilmente separados. A longa coluna permite a essa espécie viver enterrada na areia geralmente até a base do disco oral, com a base da coluna ligada à rocha abaixo da camada de areia. *P. variabilis* é comumente encontrada formando grupos ou com pólipos separados. Alimenta-se de zooplâncton embora também dependa da nutrição autotrófica.

***Zoanthus sociatus* Ellis, 1767**

Apresentam pólipos verde-brilhantes azulados com diâmetro do disco oral de aproximadamente 5 mm. Apresenta altura do pólipo entre 3 e 30 mm. Ocorre do médio ao infralitoral. As colônias grandes se fixam a substratos bastante variáveis como blocos rochosos, pedras soltas, conchas de moluscos, esqueletos de madreporários e *Millepora* spp.

Colônias de pólipos alongados, frequentemente afilados no sentido da base pela qual se encadeiam, formando colônias com algumas centenas de indivíduos interligados por estolões entrelaçados. Tentáculos filiformes, em número de 48 a 57.

Embora bastante abundantes na costa brasileira, trabalhos com zoantídeos no Brasil são escassos. Apenas Longo; Arias e Schlenz (2000) realizaram um estudo da sistemática do zoantídeo *Z. soaictus*, entretanto, de maneira geral, estudos sobre a ecologia desses animais são escasso na literatura.

3. A Simbiose entre Cnidários e Micro-organismos

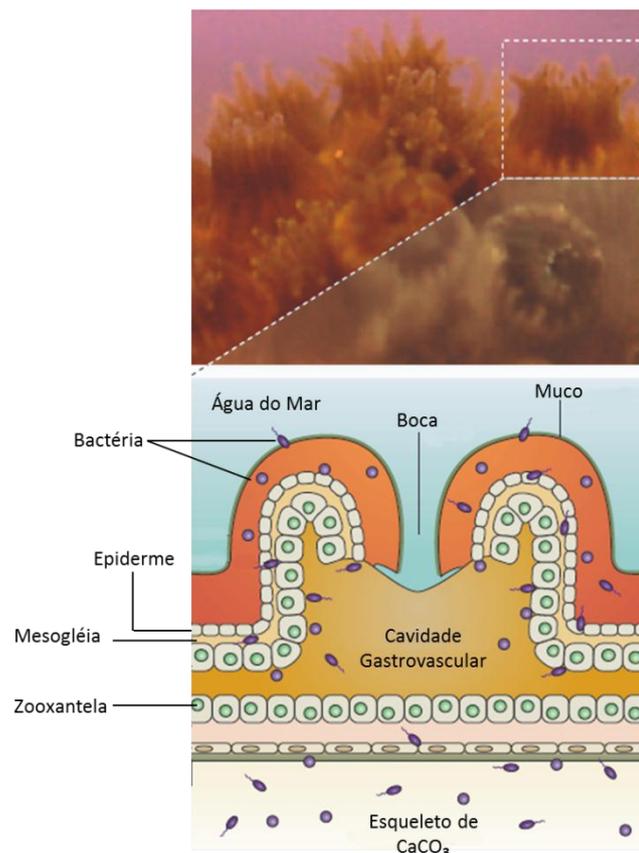
Segundo Townsend; Begon; Harper (2010) o termo simbiose (“viver junto”) foi cunhado para as associações físicas estreitas entre espécies nas quais um “simbionte” ocupa um espaço fornecido por um “hospedeiro” e onde, muitas vezes, há benefício mútuo. Munn (2004) acrescenta que a simbiose é uma relação mutualista permanente onde ambas as partes se beneficiam. Esse autor comenta ainda que os simbiontes apresentam especial adaptação para a essa condição e em alguns casos eles podem perder a habilidade de existir independentemente de seu hospedeiro (simbiose obrigatória), embora alguns micro-organismos sejam capazes de viver fora de seus hospedeiros (simbiose facultativa).

A simbiose em corais é caracterizada por uma associação fechada e dinâmica entre o animal (hospedeiro) e uma diversidade de micro-organismos associados (simbiontes) incluindo, protozoários, fungos, arqueias, bactérias e vírus (WEGLEY *et al.*, 2007; LINS-DE-BARROS *et al.*, 2010; RYPIEN; WARD; AZAM, 2010). Juntos, hospedeiro e simbionte compõem um conjunto de organismos conhecido como Holobionte.

Durante muito tempo os dinoflagelados fotossintéticos do gênero *Symbiodinium*, conhecidos como zooxantelas, foram considerados os únicos endossimbiontes de invertebrados marinhos (OLSON *et al.*, 2009). No entanto, recentes avanços em biologia molecular revelaram uma comunidade diversificada e altamente dinâmica de bactérias (ROHWER *et al.*, 2002), além da descoberta de outros simbiontes como fungos (WEGLEY *et al.*, 2007), arqueias (LINS-DE-BARROS *et al.*, 2010; SIBONI *et al.*, 2008) e vírus (MARHAVER; EDUARD; ROWER, 2008). Com essas descobertas sabe-se agora que os corais apresentam múltiplos simbiontes, formando um sistema complexo e altamente dinâmico (KNOWLTON; ROHWER, 2003), embora as zooxantelas e as bactérias sejam os simbiontes mais estudados.

Os corais provêm vários microhabitats para bactérias (simbiontes extracelulares) e zooxantelas (simbiontes intracelulares): a camada de muco superficial, o tecido que forma a gastroderme e a epiderme e o esqueleto calcário, onde cada microhabitat pode ter uma comunidade distinta (ROSENBERG *et al.*, 2007) (Figura 2).

Figura 2: Habitats possíveis para os micro-organismos associados aos cnidários. A parte superior da figura corresponde ao coral *Oculina patagonica*. Modificado de Rosenberg *et al.* (2007).



Gómez-Cabrera *et al.* (2008) comentaram que os cnidários podem adquirir seus simbiontes de várias maneiras. Os simbiontes podem ser passados de uma geração para a próxima através dos ovos (transmissão fechada ou vertical) ou cada geração pode adquirir simbiontes de seu ambiente (transmissão aberta ou horizontal)

Independente do modo de aquisição, muitos micro-organismos simbiontes estão envolvidos na fisiologia do hospedeiro, gerando benefícios como a troca de nutrientes e a formação do esqueleto calcário (WEGLEY *et al.*, 2007).

Estudos pretéritos consideravam os fungos como parasitas em corais e que esses micro-organismos seriam capazes de atacar os pólipos e as zooxantelas. Entretanto, atualmente

acredita-se em um papel benéfico desses organismos. Wegley *et al.* (2007) encontraram fungos associados ao coral *Porites asteroides* e verificaram que esses simbiontes estão envolvidos no metabolismo do carbono e nitrogênio, sugerindo que esses micro-organismos são mais importantes para o coral do que previamente se pensava. Esses autores acreditam que os fungos estão envolvidos em, pelo menos, dois processos do ciclo de nitrogênio nos corais, incluindo redução de nitrato/nitrito a amônia e assimilação da amônia para uso na biossíntese.

Diversas espécies do domínio Archaea também são encontradas em corais e aparentemente geram benefícios para o hospedeiro. Siboni *et al.* (2008) observaram que arqueias oxidantes de amônia, encontradas no muco de corais, participam ativamente da reciclagem de nitrogênio no holobionte.

Lins-de-Barros *et al.* (2010) também encontraram arqueias associadas a corais. Esses pesquisadores verificaram que a maioria das sequências do gene RNAr 16S de arqueias encontradas nos corais brasileiros *Siderastrea stellata* e *Mussismilia hispida* eram desconhecidas, demonstrando a necessidade de mais estudos sobre a identificação desses micro-organismos associados a corais.

Os constituintes menos estudados no holobionte são os vírus. Muitos dos vírus encontrados em corais são fagos, isto é, vírus que infectam bactérias (WEGLEY *et al.*, 2007). Por exemplo, Marhaver; Eduard; Rower (2008) encontraram fagos de cianobactérias e de vibrios, os quais foram abundantes tanto em corais saudáveis como branqueados. Os vírus associados ao coral podem infectar todos os componentes do holobionte: coral, zooxantelas e bactérias. Assim, os vírus parecem ter importante influência na saúde de todo o holobionte.

Os simbiontes são componentes críticos de ecossistemas recifais e a simbiose entre os corais e os micro-organismos é a chave da sobrevivência dos ecossistemas recifais e de toda a fauna associada a eles (BAKER, 2003). Entretanto, embora de grande importância na sobrevivência do holobionte, os micro-organismos associados aos corais são extremamente sensíveis a impactos de origem antrópica.

4. Corais x Impactos Antrópicos

Nas últimas duas décadas houve um aumento do número de trabalhos documentando as dramáticas mudanças e o declínio de recifes de coral no mundo e estima-se que cerca de

3% ou mais desses ambientes se encontrem severamente impactados (WILKINSON, 2002). Segundo o mesmo autor, dentro de poucos anos acredita-se que 60% dos recifes de corais do mundo estejam completamente danificados, particularmente devido à ação humana

As principais causas da destruição dos recifes de corais são o estresse gerado pela poluição orgânica e inorgânica de origem agrícola e industrial; a sedimentação devido ao desmatamento de áreas costeiras; a sobre-pesca, principalmente devido a métodos destrutivos de captura; o turismo e o aquecimento global (WILKINSON, 2002; SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001).

Garren *et al.* (2009) mostraram que a poluição costeira oriunda da piscicultura intensiva é uma das grandes ameaças para os recifes de coral. Segundo esses autores a piscicultura é uma provável fonte de patógenos com potencial para proliferar em corais, ressaltando a necessidade de práticas de aquicultura melhoradas que possam atingir os objetivos da indústria sustentável e de longo prazo.

Outro impacto de origem antropogênica nos recifes de coral é o turismo (HARDIMAN; BURGIN, 2010, LUNA; PÉREZ; SÁNCHEZ-LIZASO, 2009). Impactos gerados por atividades recreacionais vêm declinando as populações de recifes de coral no mundo. Spalding; Revilious; Green (2001) discutiram que o mergulho recreacional em recifes de corais é atualmente uma indústria global. Esses autores citam que o número de visitantes da Grande Barreira de Corais da Austrália aumentou dez vezes (de 1 para 10 milhões de pessoas) em apenas 10 anos. Recifes de coral que são explorados pelo turismo muitas vezes apresentam as colônias quebradas ou doentes, devido ao contato manual e impacto das nadadeiras de mergulhadores. Além disso, a sedimentação devido ao sedimento do fundo inconsolidado que é revolvido durante a atividade de mergulho, prejudicam a fotossíntese das zooxantelas e consequentemente causando a morte dos corais.

Outro impacto que tem levado ao declínio dos recifes de coral é a acidificação dos oceanos. Os recifes de coral constroem seus esqueletos a partir dos íons carbonato presentes na água do mar, processo dependente das zooxantelas. A concentração desses íons, no entanto, está relacionada ao pH da água e, com o processo de acidificação dos oceanos, essa concentração pode se reduzir à metade até 2100, o que comprometerá a sobrevivência dos corais. Isso é devido ao fato de que o gás carbônico absorvido pela água se transforma em ácido carbônico, tornando a água menos alcalina (o oceano é naturalmente básico, com pH entre 7,5 e 8,5). Assim, quando o meio está mais ácido, há menos carbono inorgânico

dissolvido na forma de carbonato e mais na forma de bicarbonato, o que dificulta seu uso pelas zooxantelas e conseqüentemente pelos corais, fazendo com que sua calcificação seja inibida (BARBOSA *et al.*, 2006).

Atualmente é amplamente aceito que as doenças de corais podem ter uma significativa contribuição na degradação dos recifes e recentes surtos de novas doenças em corais têm gerado epidemias nesses ambientes, levando ao declínio de muitas espécies de corais (COONEY *et al.*, 2002). Embora essas doenças sejam um problema ecológico importante, suas causas e patogêneses são pobremente conhecidas. A doença da banda negra (*Black Band disease* ou BBD) está entre as mais importantes, (EDMUNDS; GATES; GLEASON, 2001). E acredita-se que a BBD seja ocasionada por micro-organismos oportunistas como bactérias e fungos, embora ainda pouco seja conhecido sobre o causador exato dessa doença (COONEY *et al.*, 2002).

Alguns estudos demonstram que a comunidade bacteriana de toda a colônia é afetada mesmo quando somente uma pequena parte da colônia mostra sinais de doença e, muitas vezes, as mudanças na microbiota normal acontecem antes mesmo de serem visualizados sinais de estresse nas colônias. O aumento da atividade humana na região costeira adjacente aos recifes de coral e aquecimento das águas oceânicas podem levar a mudanças na comunidade bacteriana associada com efeitos adversos na saúde do coral. Em alguns casos, as doenças têm sido diretamente relacionadas a espécies de bactérias que aumentam sua virulência em altas temperaturas. Em particular as doenças são resultantes de infecções provocadas por bactérias do gênero *Vibrio* onde muitas vezes o fator de virulência é produzido somente em elevadas temperaturas (BANINN *et al.*, 2001; BANINN *et al.*, 2003; TOREN *et al.*, 1998).

Vibrios associados com corais podem ser patógenos oportunistas. Luna; Biavasco; Denovaro (2007) verificaram que a abundância de vibrios em corais doentes é significativamente maior do que em corais saudáveis, indicando que esses micro-organismos estão, provavelmente, associados a doenças nos corais.

A presença de corais doentes já pode ser observada no Brasil. Francini-Filho *et al.*, (2008) relataram que muitas espécies de corais em Abrolhos, Bahia já apresentam sinais de doenças e que esses corais podem entrar em declínio em poucos anos.

Outro impacto que vem prejudicando o holobionte é a floração de algas nocivas. Bauman *et al.* (2010) verificaram que nos meses de Outubro e Novembro de 2008, um grande evento de floração de microalgas no Golfo Pérsico causou a perda total dos corais das

espécies *Pocillopora* sp. e *Acropora* sp., além de uma redução substancial na abundância, riqueza e diversidade da comunidade associada a esses recifes, incluindo as comunidades de peixes recifais. Embora os agentes causadores desta floração sejam desconhecidos, os autores acreditam que o enriquecimento das águas costeiras devido ao aporte de matéria orgânica de origem continental, descargas de águas de lastro, além de mecanismos naturais sejam as principais causas. Dentre os efeitos nocivos das florações estão a produção de toxinas que podem envenenar os animais e anoxia. Com as rápidas mudanças no clima oceânico, grandes eventos de florações estão previstos, afetando significativamente as comunidades marinhas.

Outro problema que afeta os corais refere-se à sua capacidade natural de mudar a comunidade de simbioses e esse balanço pode ser alterado por impactos antrópicos. Os simbioses podem ser dispersos facilmente a longas distâncias pelo oceano através de correntes ou carreados através da água de lastro em navios de carga (LAJEUNESSE; LOH; TRENCH, 2009). Assim, espécies exóticas introduzidas poderiam ser uma fonte para novas combinações de simbioses, prejudicando o padrão natural de simbiose de muitas espécies.

Contudo, o impacto que tem causado maior preocupação em relação à sobrevivência dos recifes de coral e que vem ocorrendo a nível global é o fenômeno conhecido como branqueamento. O branqueamento de corais é caracterizado pela despigmentação da colônia em consequência da desestabilização da relação simbiótica entre o coral e as zooxantelas, resultando em perda desses simbioses e/ou dos seus pigmentos fotossintetizantes (FAGOONEE *et al.*, 1999; FITT *et al.*, 1993). Distúrbios ambientais podem interromper essa delicada simbiose, causando dissociação entre as zooxantelas e os corais e, neste caso, o coral perde sua cor, exibindo o esqueleto calcário branco, o que originou o nome branqueamento (LEÃO; KIKUCHI; OLIVEIRA, 2008).

De acordo com Glynn (1990), os efeitos fisiológicos e ecológicos do branqueamento de corais incluem declínio na taxa de crescimento, já que as zooxantelas auxiliam nesse processo; declínio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; regressão de gônadas e necrose do tecido do coral.

O branqueamento tem como causa principal o estresse térmico devido ao aumento da temperatura da água superficial, mas há outros fatores que causam esse fenômeno, tais como alta incidência de luz ultravioleta, variações de salinidade, poluição e soterramento das colônias em consequência de altas taxas de sedimentação (HUGHES *et al.*, 2003). Shakun *et al.* (2012) discutiram que a temperatura da terra tem se elevado em consequência da alta

concentração de CO₂ atmosférico. No ambiente marinho, um aumento de apenas 0,5 °C acima do limite de temperatura que um coral pode tolerar pode levar ao estresse e ao branqueamento (MAYAL; FERREIRA; SIAL, 1997; MAYAL; SIAL; FERREIRA, 1995). O branqueamento é uma resposta a essas mudanças, podendo ser um bioindicador importante de impactos ambientais nesses ambientes.

Weis (2008) discutiu os cinco diferentes mecanismos celulares de perda de simbiontes de tecidos do hospedeiro em consequência do branqueamento: 1) Perda de simbiontes por degradação *in situ*, onde as zooxantelas morrem dentro da célula do hospedeiro e são digeridas ou expulsas; 2) Simbiontes são perdidos via exocitose e são expulsos dentro da cavidade gastrovascular e eliminados para o meio externo; 3) Desprendimento de células do hospedeiro quando seus simbiontes ainda residem no meio intracelular, nesse caso as células do hospedeiro se destacam da mesoglêia e são liberados na cavidade gastrovascular; 4) Células do hospedeiro sofrem apoptose, liberando os simbiontes na cavidade gastrovascular onde são degradados; 5) Células do hospedeiro morrem por necrose e explodem lançando seu conteúdo, incluindo simbiontes viáveis ou degradados, na cavidade gastrovascular de onde são eliminados.

No Brasil o fenômeno de branqueamento vem sendo estudado desde 1995 por Mayal; Sial; Ferreira. Migotto (1997) observou o branqueamento de uma espécie de coral após um evento de anomalia térmica na água superficial. Posteriormente, Castro e Pires (1999); Costa; Amaral; Sassi. (2001); Dutra; Kikuchi; Leão (2000); Leão; Kikuchi; Oliveira (2008) e Kikuchi *et al.* (2004) verificaram o branqueamento de várias espécies de corais no litoral do Nordeste, fenômeno que, segundo esses autores, foi relacionado ao aumento da temperatura superficial da água.

No estado do Ceará, Soares e Rabelo (2012 *in press*) relataram o branqueamento do zoantídeo *Zoanthus sociatus* e dos corais *Favia gravida* e *Siderastrea stellata*, ocorrido em 2009. Esses autores observaram um efeito de branqueamento severo com morte das colônias de *Z. sociatus* e, desde então, as colônias desse zoantídeo não mostraram sinais de recuperação, enquanto *F. gravida* e *S. stellata* recuperaram suas colônias pós-branqueamento. Os autores relacionaram o evento de branqueamento dos corais no Ceará com um aumento da radiação solar nesse período e um aumento da temperatura superficial da água do mar.

Os humanos dependem dos recifes de coral. Esses ambientes são críticos para a sobrevivência de milhões de pessoas ao redor do mundo e os impactos que os recifes vêm sofrendo são uma ameaça à biodiversidade e à economia de muitos países. Segundo Spalding; Ravilious; Green (2001) as causas desta ameaça ou a falha para reagir a elas podem na maioria dos casos ser relacionadas a dois problemas principais: a falta de conhecimento sobre os recifes e uma falta de propriedade ou responsabilidade sobre eles. Ainda de acordo com esses autores, felizmente o conhecimento detalhado sobre recifes está melhorando rapidamente e atualmente já se conhecem as consequências de ações antrópicas e um grande número de programas de monitoramento foi criado tanto por cientistas como por amadores treinados, acumulando grande quantidade de informações sobre o estado atual dos recifes de coral e como eles mudam ao longo do tempo frente aos impactos humanos.

De acordo com Spalding; Ravilious; Green (2001) várias estratégias podem ser desenvolvidas para atenuar os impactos causados pelo homem em recifes de corais, dentre eles: estudos sobre a situação atual e monitoramento dos recifes de corais no mundo; a criação de áreas protegidas, que regularizem as atividades de pesca e turismo; restrições sazonais da pesca e turismo, protegendo o ciclo reprodutivo de algumas espécies; restrições dos apetrechos de pesca, com fiscalização intensiva das atividades mais impactantes e maior proteção de algumas espécies, com a completa proibição da captura de animais para diversos fins, como o aquarismo.

No Ceará, mais estudos sobre a fauna de ambientes costeiros são imprescindíveis, de modo a se conhecer a real situação da biodiversidade costeira gerando informações importantes para a criação de futuros planos de manejo. Além disso, uma legislação mais rígida e programas de educação ambiental conscientizando a população costeira sobre a importância dos recifes são importantes ferramentas para a preservação desses ambientes. Estudos sociais e econômicos nas comunidades humanas adjacente aos recifes cearenses também são indispensáveis, para uma clara compreensão de como gerenciar e utilizar os recifes de maneira sustentável, visando a convivência mais parcimoniosa de seres humanos e meio ambiente.

As ameaças aos recifes de coral em todo o mundo dão caráter de urgência às pesquisas nesses ambientes e o conhecimento da comunidade microbiana associada a corais e como essas associações mudam ao longo do tempo é uma das principais ferramentas para o conhecimento da saúde dos recifes (BOURNE; MUNN, 2005). O monitoramento da

comunidade de simbioses ao redor do mundo é essencial para o conhecimento da resposta a longo prazo dos recifes de coral frente às mudanças climáticas (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

As relações íntimas entre simbioses e hospedeiros sugere uma evolução paralela de cnidários e simbioses (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005) e o conhecimento dos micro-organismos associados aos corais é crítico para o entendimento sobre a evolução passada, distribuição presente e futuro destino de recifes de coral e dos ecossistemas que eles suportam (MUSCATINE; PORTER, 1977).

A grande sensibilidade dos ambientes recifais frente a impactos antrópicos e a ausência de trabalhos no Brasil que descrevam a diversidade de simbioses em corais, particularmente em zoantídeos, justifica a relevância dessa pesquisa. Além disso, a observação prévia sobre o comportamento de zoantídeos na costa cearense motivou o desenvolvimento da presente pesquisa. Em 2007 foram observadas diferenças na habilidade competitiva e na resistência desses animais a diferentes situações ambientais (RABELO, 2007). Em virtude disso, optou-se por continuar a pesquisa com esses animais de modo a se conhecer a influência de micro-organismos simbioses no padrão comportamental observado e na sua fisiologia.

Diante do exposto, esse trabalho objetiva levantar dados sobre a simbiose entre bactérias, zooxantelas e zoantídeos, focando em aspectos da diversidade e estrutura de comunidades desses simbioses. Além disso, a partir dos dados levantados discutiremos sobre o papel biológico desempenhado pelos simbioses objetivando entender a importância desses micro-organismos na sobrevivência de seus hospedeiros.

Para tal, o trabalho foi dividido em dois capítulos: O primeiro abordará a comunidade bacteriana associada aos zoantídeos e o segundo trata da simbiose entre zooxantelas e zoantídeos.

CAPÍTULO I

Bactérias Associadas a Zoantídeos

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são conhecidas como simbiontes abundantes em muitas espécies de corais e representam o componente mais diverso do holobionte (ROHWER *et al.*, 2002; BOURNE E MUNN, 2005).

Nos últimos anos muitas pesquisas têm revelado que os corais podem abrigar uma microbiota bacteriana diversa (BOURNE; MUNN, 2005; CHIMETTO *et al.*, 2009; CHIU *et al.*, 2012; COONEY *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2008; LAMPERT *et al.*, 2006, 2008; OLSON *et al.*, 2009; ROHWER *et al.*, 2002; SCHMITT *et al.*, 2011; SHARON; ROSENBERG, 2008; WEGLEY *et al.*, 2007).

Diversos outros invertebrados também são hospedeiros de bactérias, dentre eles esponjas (LI *et al.*, 2011; TURQUE *et al.*, 2007) e ascídias (MARTÍNEZ-GARCIA *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-GARCÍA; DÍAS-VALDÉS; ANTON, 2010; MENEZES *et al.*, 2010; MEZITI *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2010; PÉREZ-MATOS; ROSADO; GOVIND, 2007; TAIT; CARMAN; SIEVERT, 2007).

Em corais, as bactérias são abundantes dentro dos tecidos e na camada superficial de muco e assim como nas esponjas, pouco ainda é conhecido sobre a diversidade e estrutura dessas comunidades (LAMPERT *et al.*, 2006; 2008; RAINA *et al.*, 2009; SWEET; CROQUER; BYTHELL, 2011).

O muco produzido por corais é um meio propício para o desenvolvimento bacteriano e o principal local de crescimento desses micro-organismos (LAMPERT *et al.*, 2008; SHARON; ROSENBERG, 2008). Foi sugerido que o muco de diferentes espécies de coral abriga diferentes espécies de bactérias e a composição da comunidade bacteriana está relacionada com a composição química do muco de cada espécie de coral (SHARON; ROSENBERG, 2008; WEGLEY *et al.*, 2007).

O muco é composto de polissacarídeos e proteínas e apresenta várias funções, como auxiliar na adesão e captura de alimento, defesa contra patógenos, resistência à dessecação, proteção contra radiação e contra mudanças de temperatura e salinidade, impede o crescimento epilítico e epizóico, além de auxiliar na reprodução facilitando o assentamento das larvas (LAMPERT *et al.*, 2006; SHARON; ROSENBERG, 2008). Essa substância é periodicamente sintetizada pelos corais e liberada na água circundante, onde atua como fonte de nutrientes para diversas espécies de animais. Algumas espécies de coral, como *Acropora* sp. produzem cerca de 4,8 litros de muco por metro quadrado de colônia por dia. Parte desse

muco se dissolve rapidamente na água enquanto que o restante eventualmente precipita no fundo de poças de maré, funcionando posteriormente como alimento para espécies heterotróficas (SHARON; ROSENBERG, 2008)

O muco é um meio de cultura para diversas bactérias, as quais utilizam os corais como abrigo e em troca beneficiam seus hospedeiros de diversas maneiras, como será comentado posteriormente.

As populações do muco e do tecido do coral podem ser diferentes, evidenciando que as bactérias são adaptadas a diferentes micro-habitats dentro de um único pólipó de coral (SHARON; ROSENBERG, 2008). A diversidade de bactérias em uma única colônia de coral é claramente muito maior que a de zooxantelas (2 a 3 tipos zooxantelas versus, pelo menos, 30 espécies de bactérias) (ROHWER *et al.*, 2002). Esses mesmos autores verificaram que diferentes espécies de corais têm distintas espécies de bactérias, mesmo quando fisicamente adjacentes, enquanto que a comunidade de bactérias de uma determinada espécie de coral é sempre a mesma, mesmo separada pelo tempo e espaço. A diversidade de bactérias associadas aos corais é tão pouco conhecida que Lampert *et al.* (2006) afirmaram que 30% das bactérias isoladas do muco de um coral estudada correspondem a novas espécies e novos gêneros.

A maioria dos trabalhos envolvendo a identificação de bactérias associadas a corais evidenciou que as bactérias do filo Proteobacteria são as mais abundantes nos tecidos de muitos corais (APPRILL *et al.*, 2009; BOURNE; MUNN, 2005; GÄRTNER *et al.*, 2011; HUNTER; MILLS; KOSTKA, 2006; KALIMUTHO; AHMAD; KASSIM., 2007; KOOPERMAN *et al.*, 2007; NEULINGER *et al.*, 2008; PACHIADAKI *et al.*, 2011; ROWHER *et al.*, 2002; SUNAGAWA; WOODLEY; MEDINA, 2010). De acordo com Madigan *et al.* (2010) o filo Proteobacteria é o maior e metabolicamente mais diverso filo bacteriano e exibe uma diversidade excepcionalmente ampla de mecanismos de produção de energia, além de ampla diversidade morfológica e fisiológica. Filogeneticamente, com base em sequências do gene RNAr 16S, o filo Proteobacteria divide-se em cinco classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, DeltaProteobacteria e Epsilonproteobacteria, cada uma contendo muitos gêneros e espécies.

No Brasil, pesquisas envolvendo a diversidade de bactérias associadas a corais tem evidenciado uma grande diversidade de Filos bacterianos. A primeira pesquisa envolvendo a identificação de bactérias presentes em corais brasileiros foi realizada por Lins-de-Barros *et al.*

(2007). Posteriormente, outros trabalhos envolveram a identificação molecular de bactérias em corais e zoantídeos brasileiros (CHIMETTO *et al.*, 2008, 2009, 2010; FRANCINI-FILHO *et al.*, 2008). Entretanto, conhecimento sobre a microbiota associada a corais e zoantídeos brasileiros ainda é escasso.

1.1 Funções biológicas e adaptações fisiológicas entre cnidários e bactérias simbiotes

Rohwer *et al.* (2002) discutiram que não se tem uma clara definição sobre o papel ecológico das bactérias associadas aos corais. Segundo os mesmos autores, embora comuns em relações simbióticas, as bactérias também são encontradas na forma livre na água do mar. Um benefício indireto das bactérias marinhas de vida livre é o suprimento de nutrientes para os corais. Bactérias marinhas de vida livre representam um recurso alimentar de alta qualidade para flagelados. Esses organismos servem de alimento para ciliados que por sua vez são ingeridos por copépodos os quais são eficientemente capturados pelos corais.

Em águas oligotróficas, como nos oceanos, os micro-organismos assimilam nutrientes essenciais dentro da alça microbiana (AZAM *et al.*, 1983) e, em virtude do seu sistema de transporte de alta eficiência e sua grande área de superfície em relação ao volume, procariontes são muito mais eficientes na captação de nutrientes em concentrações baixas quando comparados às células eucarióticas (NISSEN; NISSEN; AZAM, 1984). Dessa forma, os procariontes têm maior probabilidade de assimilar a maioria dos nutrientes limitantes. Neste contexto, os corais podem adquirir os nutrientes necessários ao seu metabolismo por diversas formas, dentre elas através da captura de bactérias da coluna d'água por meio do muco e incorporação dos nutrientes aos tecidos e indiretamente, por meio da ingestão de protozoários que se alimentam de bactérias (BAK *et al.*, 1998; FERRIER-PAGES *et al.*, 1998). Assim, as bactérias desempenham uma função chave na teia alimentar marinha, sendo os corais indiretamente beneficiados por esses procariontes de vida livre (JENSEN *et al.*, 2008).

Importante destacar que não apenas as bactérias de vida livre mas também as simbiotes apresentam relevante participação na ecologia dos corais (JENSEN *et al.*, 2008). As bactérias simbiotes que vivem nos tecidos e no muco superficial dos corais também têm um papel importante na sobrevivência dos recifes e conseqüentemente da biota presente nesses ambientes. Por exemplo, de acordo com uma pesquisa de Rohwer *et al.* (2002) muitos

ribotipos bacterianos associados a corais são estreitamente relacionados a bactérias fixadoras de nitrogênio, além de atuarem na produção de antibióticos.

O nitrogênio dissolvido sob a forma de dinitrogênio (N_2) é a forma mais abundante de nitrogênio no ambiente marinho. No entanto, o dinitrogênio só está disponível para os organismos que podem, através de um processo conhecido como fixação de nitrogênio, converter dinitrogênio a amônia, a qual posteriormente pode ser assimilada em diversas formas de nitrogênio orgânico (OLSON *et al.*, 2009). Este processo é completado pela nitrogenase, uma enzima produzida por vários grupos de Bactéria e Archaea (ZEHR *et al.*, 2003).

Pesquisas têm revelado que algumas bactérias simbiotes têm a capacidade de assimilar N_2 beneficiando o coral hospedeiro com o nitrogênio fixado. Bactérias fixadoras de nitrogênio foram primeiramente encontradas em associação com o coral *Favia fava* (SHASHAR *et al.*, 1994). De acordo com os resultados desses autores, a atividade da nitrogenase evidenciou a presença de bactérias envolvidas no processo de fixação de nitrogênio nos tecidos do coral.

Wegley *et al.* (2007) encontraram uma grande densidade de cianobactérias na superfície de algumas espécies de coral e verificaram a presença da enzima nitrogenase, sugerindo que esses micro-organismos podem realizar fixação de nitrogênio. Segundo esses autores, a análise dos genes bacterianos mostrou que muitas bactérias encontradas no coral *Porites astreoides* estão associadas também ao metabolismo do carbono, fornecendo compostos necessários para a sobrevivência do coral.

Interessantemente, a presença de bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio em corais fornece uma fonte adicional de nitrogênio para a simbiose de dinoflagelados simbiotes contribuindo substancialmente na produtividade primária (OLSON, *et al.* 2009). De acordo com Wegley *et al.* (2007), devido ao crescimento das zooxantelas ser limitado pela presença de nitrogênio, tem sido sugerido que a simbiose entre zooxantelas e coral é dependente da simbiose entre bactérias e coral. Esses autores também verificaram que bactérias associadas aos corais possuem um grande número de genes relacionados ao processamento de açúcares e proteínas, evidenciando a grande importância desses micro-organismos na sobrevivência de seu hospedeiro.

Embora os corais sejam incapazes de se beneficiar diretamente de substâncias dissolvidas na coluna d'água, os membros da microbiota associada podem

degradar estes compostos e disponibilizar parte desses compostos para o coral. De acordo com Neulinger *et al.* (2008), muitos grupos bacterianos associados ao coral *Lophelia pertusa* são capazes de utilizar a celulose do fitoplâncton que foi ingerido pelo coral. Segundo esses autores, mesmo a quitina presente no exoesqueleto de presas como crustáceos pode ser degradada por bactérias simbiotes e cita bactérias da família Rhodobacteraceae como um dos responsáveis por essa degradação. Isso oferece uma contribuição significativa para a demanda de carbono e nitrogênio requerido pelo coral hospedeiro.

Outro benefício da simbiose diz respeito a bactérias especializadas que podem ser importantes para a proteção do coral contra patógenos, através da competição e/ou produção de metabólitos secundários (ROHWER *et al.*, 2002). Muitas bactérias marinhas antagonistas são conhecidas por aumentar a produção de antibióticos na presença de bactérias competidoras que possam entrar em contato com o coral, sugerindo que o antagonismo tem um papel crítico na prevenção contra bactérias patogênicas (RYPIEN; WARD; AZAM, 2010). Estes autores verificaram que 11,6% das bactérias simbióticas isoladas de corais foram capazes de inibir o crescimento de *Vibrio shiloi*, um patógeno típico de corais. Esses dados demonstraram que há um antagonismo entre micro-organismos simbiotes e patógenos, o que pode contribuir na resistência do coral evitando, conseqüentemente, as doenças.

Uma perturbação que poderia interferir na resistência de corais contra patógenos é a variação da temperatura da água. Muitas das bactérias associadas a corais são estreitamente relacionadas à produção de antibióticos e a temperatura pode interferir indiretamente nessa produção. Rypien; Ward; Azam (2010) mostraram que 70% das bactérias isoladas do coral *Montastrea annularis* apresentam atividade antibacteriana ótima a 25 °C, eliminando bactérias oportunistas ou patogênicas. Com um aumento de temperatura algumas bactérias parecem perder sua capacidade antagonista, permitindo assim o crescimento de bactérias patogênicas.

Uma vez que corais saudáveis são expostos a várias bactérias patogênicas do meio, é importante continuar explorando o papel da comunidade microbiana em prover uma primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos. Nesse sentido, o conhecimento acerca das bactérias associadas pode ser usado como bioindicador da saúde dos corais.

Muitos dos estudos para identificação e entendimento do papel biológico dos micro-organismos associados aos corais fazem uso de técnicas moleculares, substituindo ou apoiando técnicas tradicionais de estudo.

1.2 Métodos moleculares aplicados ao estudo da simbiose entre corais e bactérias

Estima-se que os métodos tradicionais dependentes de cultivo permitem o acesso de apenas 1-10% da diversidade microbiana existente no planeta. Essa limitação vem sendo superada com a utilização da metagenômica, abordagem molecular que faz uso da extração e análise do DNA genômico total de uma amostra, independentemente de cultivo.

Atualmente, a metagenômica tem sido utilizada como uma importante ferramenta para estudos ecológicos. Gilbert e Dupont (2011) definem metagenômica como a análise do DNA genômico de toda uma comunidade, o que diferencia de genômica, a qual se refere à análise do DNA de um indivíduo ou célula. Novas tecnologias utilizadas em estudo metagenômicos baseadas em clonagem, sequenciamento, expressão gênica e genômica comparativa tornaram-se aliadas valiosas para decifrar as informações biológicas necessárias para a conservação e monitoramento de corais. A metagenômica funcional, por exemplo, tem sido usada em grande gama de pesquisas, mais frequentemente para analisar mudanças simultâneas na expressão de genes em resposta a variações do ambiente. Outras técnicas, algumas delas discutidas a seguir, têm sido usadas como ferramentas para o estudo da biologia da simbiose entre cnidários e micro-organismos (FORÊT; KASSAHN; GRASSO, 2007).

Vários genes são utilizados como marcadores moleculares nos estudos da filogenia e taxonomia de procariotos simbiotes. O mais amplamente utilizado para esse fim é o gene codificador para o RNA ribossômico (RNAr). O gene RNAr 16S é um marcador molecular amplamente utilizado por ser universalmente distribuído nos domínios Bactéria e Archaea, ser funcionalmente constante, suficientemente conservado e de tamanho adequado, isto é, permite uma visão ampla da evolução desses micro-organismos. Muitos autores utilizam marcadores moleculares como o gene RNAr 16S no sentido de conhecer a diversidade de bactérias associadas a corais e as relações entre hospedeiro e simbiote (BOURNE; MUNN, 2005; BRÜCK *et al.*, 2007; KOOPERMAN *et al.*, 2007)

Várias técnicas podem ser utilizadas para estudar os genes ribossomais, dentre elas: clonagem e sequenciamento e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

A técnica de clonagem e sequenciamento baseia-se na amplificação de genes marcadores específicos (como por exemplo, o gene RNAr 16S para procariotos e os genes RNAr 18S, 28S e as sequências nucleotídicas do espaço intergênico (ITS) 18S-28S para eucariotos) por PCR e clonagem em uma bactéria hospedeira para que esse gene seja expresso e posteriormente sequenciado. As sequências são analisadas e comparadas com sequências depositadas em bases de dados públicos como o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

A técnica de DGGE, descrita por Muyzer; Waal; Uitterlinden (1993), baseia-se na separação de fragmentos de fitas de DNA de mesmo tamanho, mas com diferentes sequências de pares de bases nitrogenadas e na mobilidade diferencial de fitas duplas e fitas parcialmente desnaturadas de DNA em uma matriz de poliacrilamida. O ambiente desnaturante do DNA é criado pela combinação uniforme de temperatura de 60 °C e de um gradiente desnaturante linear de ureia e formamida. As migrações diferenciais baseiam-se no número de pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas complementares. Como as bases guanina e citosina (GC) se ligam mais firmemente devido às três pontes de hidrogênio que estabelecem entre si, sequências com maior conteúdo GC migram por distâncias maiores no gel antes de sofrerem desnaturações. Quanto mais as fitas de DNA se separam, mais lenta é a sua migração pelo gel. A fim de evitar a completa separação das fitas de DNA, um “grampo” rico em bases nitrogenadas GC é adicionado ao final de um dos iniciadores da reação em cadeia da polimerase (PCR) em uma das porções terminais das fitas. Nesta técnica, variações nas sequências de RNAr são exploradas para inferir relações filogenéticas entre micro-organismos e para determinar geneticamente, por meio de provas nucleotídicas, táxons microbianos individuais em seus ambientes naturais. Cada ribotipo ou UTO (Unidade Taxonômica Operacional) representa um táxon específico, e dá uma idéia quantitativa da diversidade. Essa técnica é amplamente utilizada para determinar a diversidade microbiana em corais, sendo uma técnica capaz de revelar que diferentes espécies de coral apresentam especificidade e relação aos seus simbiontes (COONEY *et al.*, 2002; BOURNE; MUNN, 2005; SWEET; CROQUER; BYTHELL, 2011).

Existem outras técnicas utilizadas para estudo de simbiontes de corais, entretanto as técnicas apresentadas anteriormente são as mais citadas na literatura científica, pela confiabilidade e praticidade.

Embora métodos independentes de cultivo forneçam detalhes da diversidade e biogeografia de organismos associados a corais, a contribuição metabólica desses simbiontes para o funcionamento do holobionte é pouco conhecida. Através de técnicas de metagenômica funcional é possível saber em que processos metabólicos as sequências estão envolvidas. É agora claro que a metagenômica, associada a ferramentas mais robustas como o pirosequenciamento podem ser usadas para prever que papéis os micro-organismos associados aos corais desempenham e como isso auxilia na sobrevivência do coral hospedeiro.

Além da importância dos estudos moleculares na identificação das relações simbióticas entre corais e bactérias, as técnicas moleculares são extremamente importantes no estudo de doenças em corais.

Doenças em corais, causando a morte de grandes colônias, são muitas vezes difíceis de serem identificadas. Aspectos da biologia molecular de vetores de doenças em corais são úteis na identificação dessas enfermidades. Em um trabalho de Cooney *et al.* (2002), pôde-se identificar, através técnicas moleculares como DGGE e sequenciamento, uma bactéria que causa doença da banda negra (*Black Band Disease* ou BBD), que causa a necrose dos tecidos e morte de muitas espécies de corais. Luna; Biavasco; Denovaro (2007) utilizaram sequências de RNAr 16S e puderam associar uma doença que causa necrose em corais à presença da bactéria *Desulfovibrio* spp. A identificação desse vibrio usando a sequências de RNAr 16S mostrou uma similaridade de 99% com *Vibrio harveyi*, bactéria tipicamente conhecida por causar necrose em corais. Reis *et al.* (2009) verificaram a diferença entre a microbiota associada em colônias saudáveis e doentes do coral brasileiro *Mussismilia brasiliensis* através da análise de sequência do gene RNAr 16S e comparação com sequências contidas no GenBank. Esses autores verificaram que a composição da microbiota associada a corais varia entre as colônias saudáveis e doentes, sugerindo que bactérias oportunistas colonizaram o coral doente. Assim, técnicas moleculares no estudo de patógenos associados às doenças em corais são importantes ferramentas para a conservação dos recifes de corais.

As técnicas moleculares contribuem ainda na elucidação de diferentes aspectos relativos à fisiologia e ao comportamento competitivo dos corais. Por exemplo, Rabelo (2007)

verificou diferentes estratégias competitivas entre os zoantídeos da costa cearense e esse fato pode estar relacionado aos micro-organismos associados.

Assim, sabendo-se que muitas espécies de bactérias são relacionadas à produção de compostos usados pelos hospedeiros na defesa contra patógenos e contra predação, o conhecimento sobre a diversidade desses simbiossitos pode ajudar a explicar o comportamento observado.

A ausência de trabalhos que reportem a comunidade bacteriana associada aos zoantídeos e a observação préterita de diferenças nas estratégias competitivas e de sobrevivência desses animais em habitat natural motivou a presente pesquisa, gerando as seguintes hipóteses: 1) Os zoantídeos apresentam uma alta diversidade de bactérias simbiossitos; 2) Cada espécie de zoantídeo apresenta uma comunidade específica de bactérias; 3) A comunidade bacteriana da água do mar circundante às colônias é semelhante à dos zoantídeos e 4) As bactérias associadas aos zoantídeos são conhecidas pelo seu papel biológico, estando intimamente envolvidas na fisiologia do hospedeiro.

Sabendo-se que os recifes de corais são ambientes extremamente ameaçados, compreender as complexas interações entre os micro-organismos e seus hospedeiros irá fornecer dados importantes para o entendimento da diversidade e funções dos simbiossitos e esse conhecimento será extremamente relevante para ações de monitoramento e conservação dos corais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a estrutura de comunidades de bactérias associadas a três espécies de zoantídeos, visando comparar os simbioses e detectar possíveis padrões que possam ser usados no monitoramento e conservação desses animais.

2.2 Objetivos Específicos

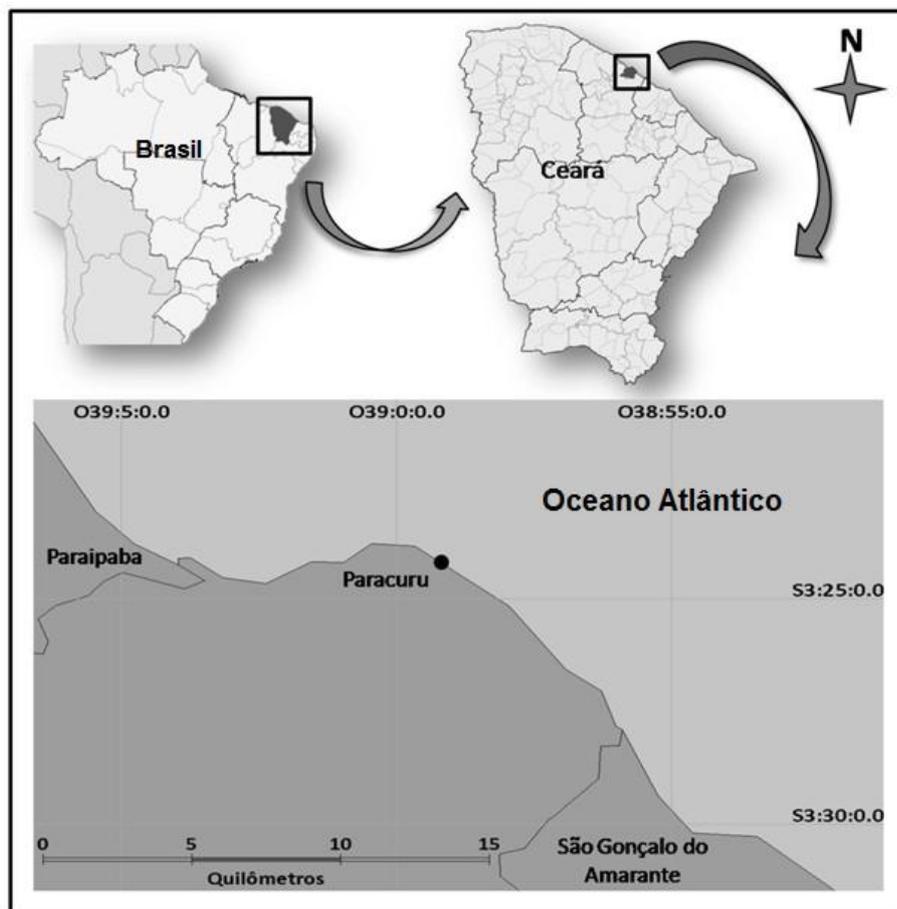
- Descrever a estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* e *Protopalythoa variabilis*;
- Verificar a presença de bactérias espécie-específicas nas três espécies de zoantídeos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de coleta:

As amostras foram coletadas nos recifes areníticos na praia de Paracuru, situada no litoral oeste do Estado do Ceará a 90 km da Capital Fortaleza (03°23'53,0''S, 39°00'38,8''W) (Figura 3).

Figura 3: Mapa de localização da área de estudo (Praia de Paracuru – Ceará, Nordeste do Brasil).



Essa área é caracterizada pela extensa faixa de recifes de arenito com cerca de 3 km de extensão. O local apresenta poças de maré e bancos de areia interrompendo a continuidade dos mesmos, gerando um ambiente de grande heterogeneidade (Figura 4). Há uma grande abundância de zoantídeos na área, principalmente nas poças de maré, as quais só são acessíveis durante a maré baixa (Rabelo, 2007).

Figura 4: Afloramentos rochosos que formam os recifes de arenito da praia de Paracuru-Ce. As setas indicam as poças de maré que se formam durante a maré baixa.



3.2 Coleta e armazenamento das amostras

As três espécies estudadas foram: *Palythoa caribaeorum*, *Protopalythoa variabilis* e *Zoanthus sociatus* (Figuras 5 e 6). Essas espécies são bastante comuns e abundantes na área de coleta, formando grandes colônias sobre o substrato. A coleta foi realizada durante a maré de sizígia na região rochosa de mesolitoral, região entre a faixa de areia e a zona de batimento das ondas.

Figura 5: Colônias de zoantídeos em habitat natural (Praia de Paracuru – Ce). (A): *Zoanthus sociatus*, (B): *Protopalythoa variabilis* e (C): *Palythoa caribaeorum*

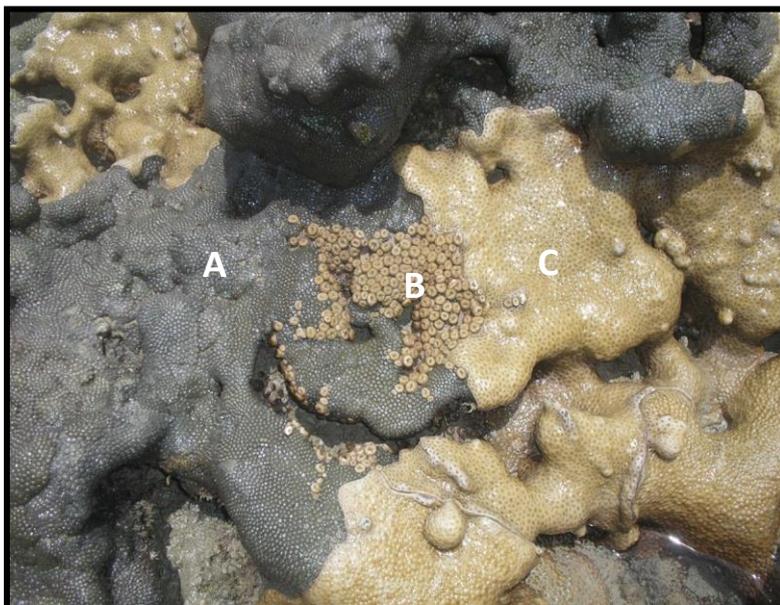
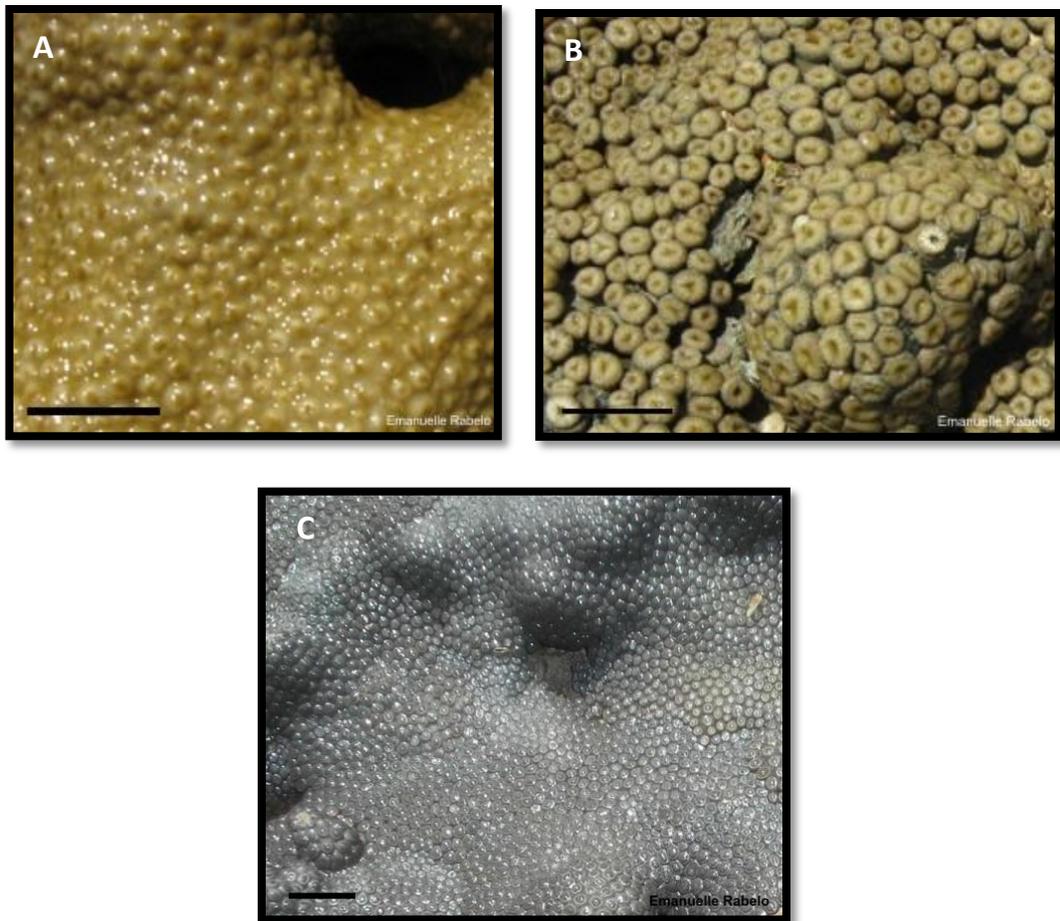


Figura 6: Detalhe das colônias de (A) *Palythoa caribaeorum*; (B) *Protopalythoa variabilis*; (C) *Zoanthus sociatus* em habitat natural. Escala: 2 cm.



As coletas foram realizadas em março de 2010. Foram escolhidas aleatoriamente 15 colônias sadias de cada espécie. As colônias escolhidas encontravam-se separadas fisicamente uma das outras de maneira a evitar a coleta e clones. Para cada colônia de zoantídeo, foram removidos cuidadosamente de seus substratos fragmentos de 5 cm² com o auxílio de bisturi (Figura 7). Sabendo-se que a microbiota associada pode estar presente tanto na camada superficial do muco como no tecido, as colônias foram raspadas até a base da coluna. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro previamente esterilizados e transportadas em caixa térmica até o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da UFC, onde foram imediatamente congeladas. Concomitantemente à coleta dos fragmentos dos zoantídeos, duas amostras de 5 litros de água do mar também foram coletadas para análise da microbiota.

Figura 7: Procedimento de coleta das amostras de tecido dos zoantídeos.



3.3 Extração do DNA total

Imediatamente antes do procedimento de extração de DNA, as amostras da mesma espécie foram transferidas para um mesmo recipiente, homogeneizadas, centrifugadas para retirada do excesso de água e maceradas com nitrogênio líquido. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de se aumentar a área de atuação do detergente utilizado na extração do DNA. O procedimento de extração foi realizado de acordo com o protocolo de extração de DNA utilizando Brometo de Cetil-Trimetilamônio (CTAB) descrito por Roger e Bendich (1985), com modificações. Após a maceração, amostras de 0,5g de cada espécie de zoantídeo foram colocadas em microtubos e acrescidos 750 μL de CTAB contendo 0,2% de β -mercaptoethanol (v/v) pré-aquecido a 60 $^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram mantidos em banho maria por 12 h, e posteriormente foram acrescentados 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) a cada tubo e a mistura agitada por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g durante 5 minutos, para separar a fase orgânica (inferior) da fase aquosa (superior). Essa etapa foi repetida para uma melhor recuperação da fase superior. O sobrenadante resultante foi coletado e transferido para um novo tubo eppendorf, onde foram adicionados 330 μL (2/3 do volume de sobrenadante coletado) de isopropanol absoluto. Essa solução foi armazenada em freezer a -20 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min e posteriormente centrifugada a 12.000 g durante 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi lavado com 400

μL de etanol 70% gelado e centrifugado durante 5 minutos a 12.000 g . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* exposto à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. O DNA contido no *pellet* foi ressuspensão em tampão contendo RNase e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a extração de DNA da microbiota da água as amostras foram filtradas em membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e os filtros macerados e submetidos ao mesmo procedimento de extração de DNA como descrito previamente.

3.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

DGGE foi usado neste estudo com o objetivo de se comparar os perfis das comunidades de bactérias das três espécies de zoantídeos. O método foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Øvreas *et al.* (1997).

Inicialmente foi feita a amplificação do gene ribossomal 16S utilizando os iniciadores 338F (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'), específicos para a região V3 do RNAr 16S. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se a enzima goTaq DNA polimerase (Promega) com seu respectivo tampão de reação como recomendado pelo fabricante. Cada reação teve um volume final de $20\text{ }\mu\text{L}$, contendo $0,2\text{ mM}$ de cada desoxinucleotídeo, $2,5\text{ mM}$ de MgCl_2 , 5 pmol de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 10 a $20\text{ ng}/\mu\text{l}$ de DNA total. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf* modelo 5341, seguido das seguintes etapas: desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, 30 ciclos de 1 minuto a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 minuto a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 minuto a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ e extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

Os géis de acrilamida foram preparados com gradientes desnaturantes de 30 a 65%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida). A eletroforese foi realizada a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a 200V constantes por 4h, em um sistema DCode (BioRad), utilizado a solução tampão TAE 50x (Tris base 2M, ácido acético glacial 1M e EDTA 50mM com pH 8). Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de *SYBR Green* (Invitrogen) na concentração de 1:10.000 (v/v) por 1h. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz violeta em fotodocumentador e analisado pela plataforma GelCompar II do programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica) para normalização, comparação e agrupamentos das imagens.

3.5 Construção de Bibliotecas do gene RNAr 16S

3.5.1 Amplificação do gene RNAr 16S

A região relativa ao 16S do DNA foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores específicos 63F (5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') e 1389 R (5' ACG GGC GGT GTG TAC AAG 3'). A reação foi realizada utilizando-se a enzima GoTaq DNA polimerase (Promega) com seu respectivo tampão de reação 10x como recomendado pelo fabricante. Cada 25 µl da reação continha DNA total, 0,5 µM de cada iniciador, 2,5 mM de dNTP, 25 mM de MgCl₂ e 0,2 U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação incluíram um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 min; 56 °C por 1 min; 72 °C por 2 min, e um passo de extensão final por 10 min a 72 °C. O controle negativo foi formado por todos os constituintes, exceto o DNA. A amplificação ocorreu em um termociclador *Eppendorf* modelo 5341. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1% e revelados com *SYBR safe DNA* (Invitrogen). Os produtos foram visualizados sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador. As bandas foram excisadas e transferidas para tubo de 1,5 mL. Os fragmentos de DNA contidos no gel foram eluídos e o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação de DNA foi feita em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies).

3.5.2 Ligação, Transformação e Clonagem

A reação de ligação foi realizada utilizando-se o Kit pGEM-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA foram inseridos no vetor e a solução de ligação foi usada para transformar células de *Escherichia coli* TOP 10 F' por eletroporação.

A reação teve um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL do tampão, 1 µL do vetor, 4 µL do DNA, 1 µL de T4 DNA Ligase (30U/µL) e 1,5µL de água estéril. A reação foi incubada por 16 horas a 4 °C. Após esse período, 2 µL da reação de ligação foram misturados a 50 µL de suspensão celular de *Escherichia coli* TOP 10 F' e esta mistura foi transferida para uma cubeta previamente resfriada e submetida a eletroporação (Eletroporador BTX modelo 399). O produto foi misturado a 1 mL do meio SOC. Essa mistura foi agitada a 150 rpm, por 1,5 hora, a 37 °C. As culturas foram semeadas em placas de Agar LB, suplementado com 0,5 mM de

IPTG, 80 µg/mL X-gal e 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 37 °C por 24 horas. Colônias brancas contendo os plasmídeos recombinantes foram coletadas utilizando-se palitos de madeira previamente esterilizados e transferidas para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura Circle Grow com ampicilina e incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação a 200 rpm. Após crescimento, os clones foram armazenados em glicerol 15% e armazenados a -80 °C. Para cada amostra, foram coletados 288 clones, dos quais 96 clones de cada amostra foram utilizados para o sequenciamento do gene 16S. Os demais clones permanecem depositados na coleção microbiana do Lembiotech. Os clones utilizados para o sequenciamento do gene 16S foram submetidos à extração plasmidial seguindo o protocolo de lise alcalina com SDS (SAMBROOK; MANIATIS, 2001).

3.5.3 Sequenciamento

Após o procedimento de extração plasmidial, 30 µL dos plasmídeos foram transferidos para uma placa multipoços a qual foi selada e enviada para sequenciamento. Os clones foram sequenciados pela empresa MacroGen, através do sequenciador ABI 3730 (www.macrogen.com). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye TM – ABI PRISM, seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Análise dos Dados

3.6.1 Análise do Gel de DGGE

As imagens dos géis de DGGE foram analisadas pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Bélgica). Este programa foi utilizado na normalização, conversão e comparação entre as bandas. O programa gerou matrizes de ausência (0) e presença (1) que foram utilizadas para verificação de bandas exclusivas e compartilhadas e para o cálculo do coeficiente similaridade de Jaccard, com tolerância ao posicionamento das bandas de 1%.

3.6.2 Análise das Bibliotecas do gene RNAr 16S

As sequências obtidas foram submetidas ao *Ribosomal Data Project* (RDP) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) para remoção de vetor, análise de qualidade e classificação taxonômica utilizando um índice de confiabilidade de 80%. As sequências obtidas foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) usando o programa MOTHUR

(SCHLOSS *et al.*, 2009) o qual foi utilizado para construção das curvas de rarefação, considerando uma similaridade de 98%.

Para sumarizar os padrões de diversidade bacteriana nas diferentes espécies de zoantídeos foram calculados os índices de diversidade alfa e beta. Para a diversidade alfa foram calculados a riqueza, os índices de diversidade de Shannon e Simpson e a equabilidade. O cálculo da riqueza e dos índices de diversidade e equabilidade das bactérias simbiotes foram realizados apenas para bactérias classificadas ao nível de gênero, uma vez que não foi possível classificar todos os organismos em resoluções taxonômicas específicas. Para comparar os valores dos índices de diversidade genérica das bactérias presentes nos zoantídeos e água do mar foi utilizado um procedimento de reamostragem (*bootstrapping approach*) através do programa Past. Para todos os testes foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$. Para comparar diferenças na composição de gêneros de bactérias entre as espécies de zoantídeos e água do mar foram calculados os índices de diversidade beta de Jaccard e de Morisita-Horn. O índice de similaridade de Jaccard quantifica o grau de sobreposição de gêneros bacterianos entre as amostras, independente da abundância relativa de cada gênero, enquanto que o índice de Morisita-Horn considera a importância da distribuição de abundância de cada gênero bacteriano. Dessa forma, a combinação do uso de ambos os índices ajudam a explorar a importância relativa de diferentes componentes de diversidade beta.

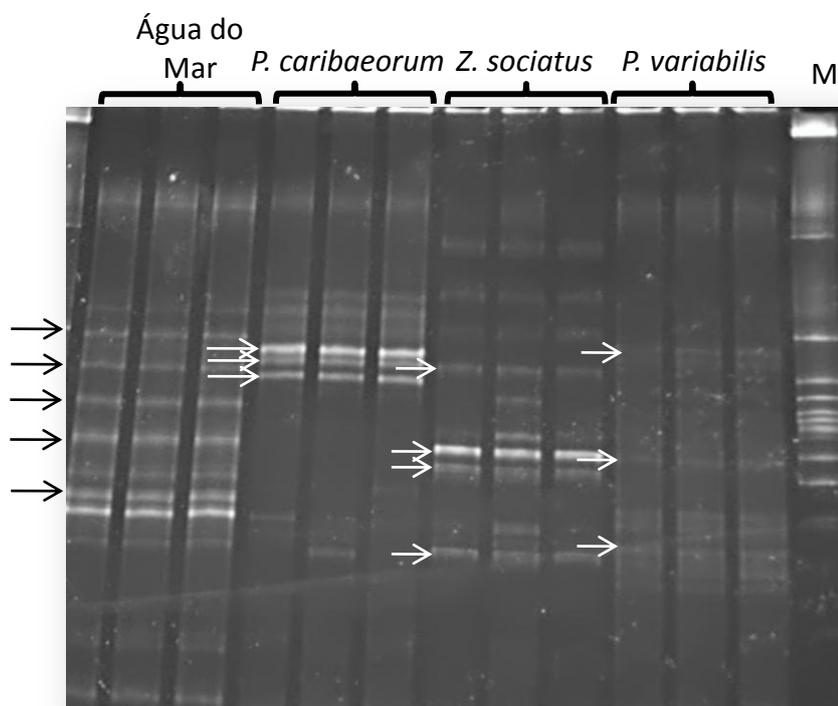
Para verificar estatisticamente as diferenças entre as bibliotecas foi utilizado o programa S-Libshuff 1.22 (SINGLETON *et al.*, 2001). Essa análise compara a semelhança entre as sequências em diferentes amostras e indica se há diferenças ($P < 0,05$) ou semelhança ($P > 0,05$) entre as amostras. Além disso, todas as sequências foram comparadas com sequências depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST para análise filogenética.

4. RESULTADOS

4.1 Estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos

Os perfis das comunidades de bactérias das três espécies de zoantídeos e da água do mar obtidos por DGGE estão mostrados na figura 8.

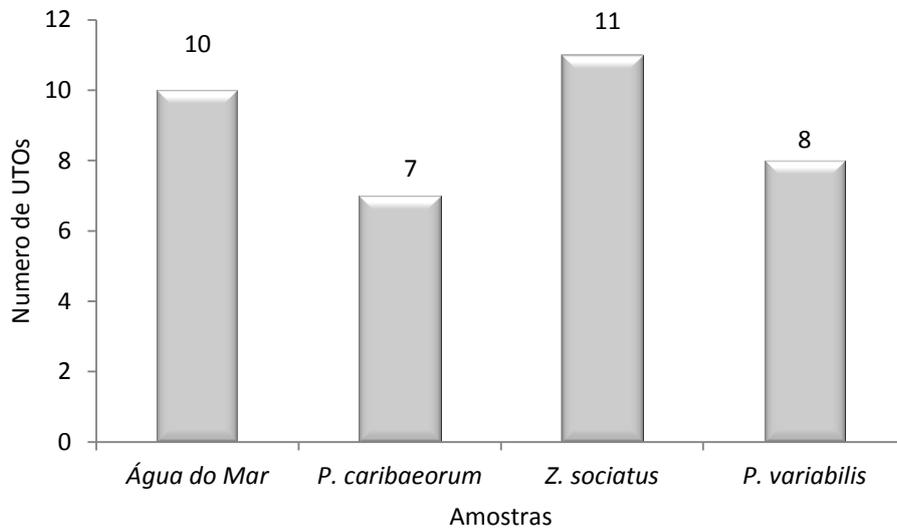
Figura 8: Estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus*, *Protopalythoa variabilis* e água do mar revelados por DGGE. Setas destacam as bandas mais intensas de cada uma das amostras. M: marcador.



O resultado da DGGE apresentado na figura 8 revela claramente que as amostras apresentam comunidades bacterianas diferentes. Esse resultado aponta para um alto grau de especificidade entre bactérias e hospedeiros.

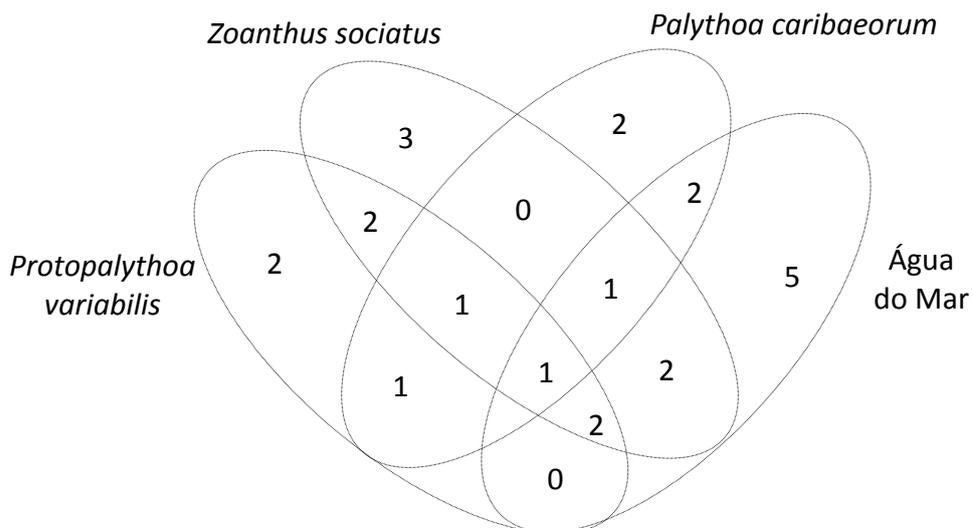
A Figura 9 mostra a riqueza de UTOs gerada a partir da análise do gel de DGGE.

Figura 9: Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas por DGGE para as amostras de zoantídeos e água do mar.



Embora aparentemente espécie-específicas, algumas UTOs bacterianas foram compartilhadas entre as amostras. A figura 10 revela a quantidade de UTOs únicas e compartilhadas entre as amostras.

Figura 10: Diagrama de Venn baseado na quantidade de UTOs únicas e compartilhadas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.



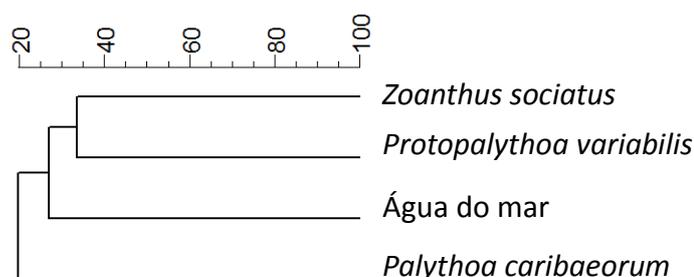
O diagrama de Venn ilustra claramente que a comunidade bacteriana é específica para cada amostra com algumas UTOs exclusivas. De acordo com os resultados, 28% das UTOs de

P. caribaeorum foram exclusivas, para *Z. sociatus* e *P. variabilis*, 27% e 25% das UTOs foram exclusivas, respectivamente. Para água do mar, 50% das UTOs foram exclusivas.

Observa-se que apenas 1 UTO é compartilhada pelos zoantídeos. As comunidades bacterianas dos zoantídeos também são bastante diferentes das encontradas na água, com apenas 1 UTO em comum entre as amostras.

A figura 11 revela a baixa similaridade entre as amostras, com *P. caribaeorum* sendo a espécie de zoantídeo que mais diferiu das demais em relação a sua composição de bactérias. Os dados de similaridade baseados nas UTOs bacterianas por DGGE indicam mais uma vez a grande diferença entre as comunidades bacterianas presentes nos hospedeiros.

Figura 11: Similaridade entre as amostras baseada no compartilhamento de UTOs revelada por DGGE.



4.2 Diversidade das comunidades bacterianas através da análise da biblioteca do gene RNAr 16S.

A diversidade bacteriana nas amostras de zoantídeos e água do mar foi analisada através de bibliotecas do gene RNAr 16S. No total, 384 clones foram sequenciados, sendo 96 clones para cada amostra. Após o sequenciamento foram obtidos 94, 74, 70 e 90 sequências para *P. caribaeorum*, *Z. sociatus*, *P. variabilis* e água do mar, respectivamente. O tamanho das sequências com qualidade Phred > 20 variou de 300 a 800 pares de bases. A tabela 1 mostra o número de UTOs obtidas para cada biblioteca sequenciada, de acordo com as análises realizadas pelo programa Mothur.

Observa-se de acordo com a tabela 1 que os clones de bactérias associadas aos zoantídeos corresponderam a muitas UTOs únicas, demonstrando uma grande riqueza. Para *P. caribaeorum*, por exemplo, dos 94 clones sequenciados, 94 deles corresponderam à UTOs únicas.

Tabela 1: Número de clones e UTOs associados às amostras de zoantídeos a água do mar.

Amostra	Nº. de clones	Nº. de UTOs
<i>Palythoa caribaeorum</i>	94	94
<i>Zoanthus sociatus</i>	74	70
<i>Protopalythoa variabilis</i>	70	62
Água do Mar	90	89

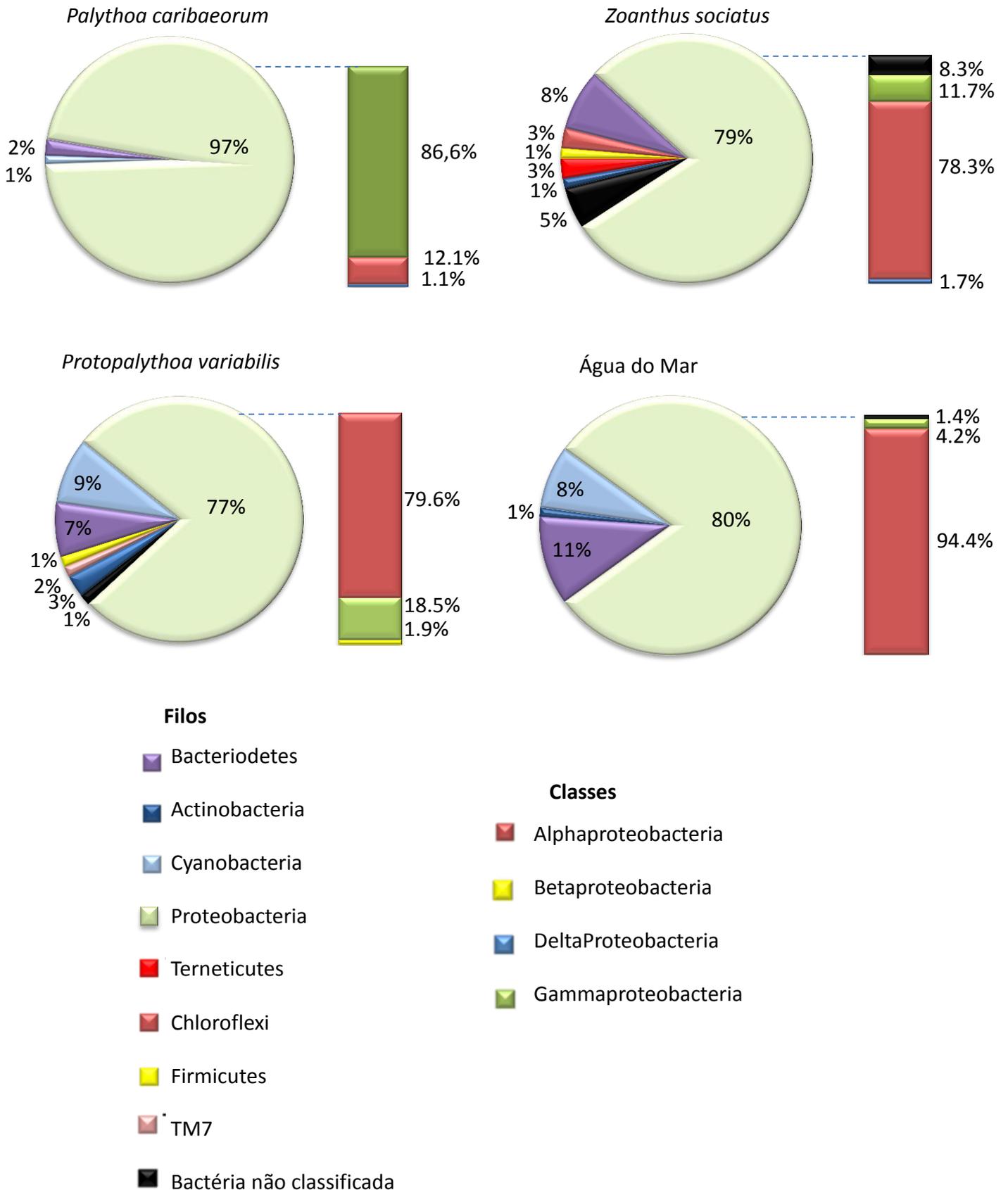
Entre as sequências classificadas, o Filo Proteobacteria foi dominante em todas as amostras, sendo a classe Alphaproteobacteria a mais abundante em *Z. sociatus*, *P. variabilis* e água do mar. Já em *P. caribaeorum* a classe Gammaproteobacteria foi a mais abundante, refletindo uma diferença na composição da comunidade bacteriana entre as amostras. A classe Betaproteobacteria foi detectada somente em *P. variabilis* e Deltaproteobacteria ocorreu somente em *P. caribaeorum* e *Z. sociatus*.

O filo Bacteroidetes foi o segundo mais abundante, ocorrendo em todas as amostras, seguido do filo Cyanobacteria que ocorreu em todas as amostras, exceto em *Z. sociatus*.

Os filios Actinobacteria e Firmicutes foram mais comuns em *Z. sociatus* e *P. variabilis* e os filios Tenericutes e Chloroflexi foram detectados somente em *Z. sociatus*. O filo TM7 foi identificado apenas em *P. variabilis*.

A Figura 12 mostra a abundância relativa dos filios e classes bacterianas classificadas em cada uma das amostras. As amostras apresentaram uma diversidade de filios bastante distinta. *Palythoa caribaeorum* e água do mar apresentaram o menor número de filios, com apenas 3 e 4 filios, respectivamente, enquanto que em *Z. sociatus* e *P. variabilis* foram identificados 6 filios bacterianos.

Figura 12: Abundância dos grupos bacterianos associados a *P. caribaeorum*, *Z. sociatus*, *P. variabilis* e água do mar. Os círculos correspondem à classificação ao nível de filo e as barras representam as classes de Proteobacteria.



Ao todo, foram identificados 32 gêneros, pertencentes a 8 filos e as 35 famílias. A maioria dos táxons apresentou baixa abundância. De todos os táxons identificados, 70% foram exclusivos para determinada espécie de zoantídeo ou água do mar amostrados. De todos os gêneros bacterianos identificados para *P. caribaeorum*, 9 deles foram exclusivamente detectados nesse zoantídeo (tabela 2).

Tabela 2: Táxons bacterianos identificados em *Palythoa caribaeorum*. O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.

Filo	Classe	Família	Gênero
Bacteriodetes	-	Flavobactériaceae	Nc
Bacteriodetes	-	Saprospiraceae*	Nc
Proteobacteria	α	Rhodobactériaceae	<i>Nautella</i> *
Proteobacteria	α	Rhodobactériaceae	<i>Jannaschia</i>
Proteobacteria	α	Rhodobactériaceae	<i>Shimia</i> *
Proteobacteria	α	Rhodobactériaceae	<i>Loktanella</i>
Proteobacteria	α	Hypomonadaceae	<i>Ponticaulis</i> *
Proteobacteria	γ	Legionellaceae	<i>Legionella</i> *
Proteobacteria	γ	Enterobactériaceae	<i>Enterobacter</i> *
Proteobacteria	γ	Alteromonadaceae	<i>Haliea</i>
Proteobacteria	γ	Moraxellaceae	<i>Enhydrobacter</i> *
Proteobacteria	γ	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> *
Proteobacteria	γ	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> *
Proteobacteria	γ	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> *
Proteobacteria	δ	Polyangiaceae*	Nc

De todos os gêneros bacterianos identificados para *Z. sociatus*, 5 deles foram exclusivamente detectados nesse zoantídeo (tabela 3).

Tabela 3: Táxons bacterianos identificados em *Zoanthus sociatus*. O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.

Filo	Classe	Família	Gênero
Bacteriodetes	-	Flavobactériaceae	Nc
Bacteriodetes	-	lamiaceae	<i>lamia</i>
Bacteriodetes	-	Sphingobactériaceae*	Nc
Firmicutes	-	Enterococcaceae	<i>Bavariicoccus</i> *
Tenericutes	-	Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i> *
Chloroflexi	-	Caldilineaceae	<i>Caldilinea</i> *
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Loktanella</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Silicibacter</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i>
Proteobacteria	α	Halomonadaceae	<i>Oceanicola</i>
Proteobacteria	γ	Nc	<i>Arenicella</i> *
Proteobacteria	γ	Ferrimonadaceae	<i>Ferrimonas</i> *
Proteobacteria	δ	Cystobacteraceae*	Nc

Protopalythoa variabilis apresentou 9 gêneros exclusivos não havendo dominância entre eles (tabela 4).

Tabela 4: Táxons bacterianos identificados em *Protopalythoa variabilis*. O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.

Filo	Classe	Família	Gênero
Bacteriodetes	-	Flavobactériaceae	Nc
Bacteriodetes	-	Flavobactériaceae	<i>Actibacter</i> *
Bacteriodetes	-	Rhodothermaceae	Nc
Bacteriodetes	-	Rhodothermaceae	<i>Salisaeta</i> *
Bacteriodetes	-	Flammeovirgaceae	Nc
Actinobacteria	-	Acidimicrobineae	<i>Iamia</i>
Cyanobacteria	-	Família II	<i>GpIIa</i>
Cyanobacteria	-	Família VIII	<i>GpVIII</i> *
Firmicutes	-	Nc	Nc
Firmicutes	-	Clostridiaceae*	Nc
Tenericutes	-	Spirolasmataceae *	Nc
TM7	-	Nc	<i>TM7 genera incertae sedis</i> *
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Loktanella</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Silicibacter</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Oceanicola</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i> *
Proteobacteria	α	Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i> *
Proteobacteria	α	Hyphomicrobiaceae	<i>Filomicrobium</i> *
Proteobacteria	β	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i> *
Proteobacteria	γ	Alteromonadaceae	<i>Haliea</i>
Proteobacteria	γ	Coxiellaceae	<i>Aquicella</i> *

Somente 3 gêneros fora exclusivos para a água do mar: *Alteromonas*, *Enterovibrio* e *Propionibacterium* (tabela 5).

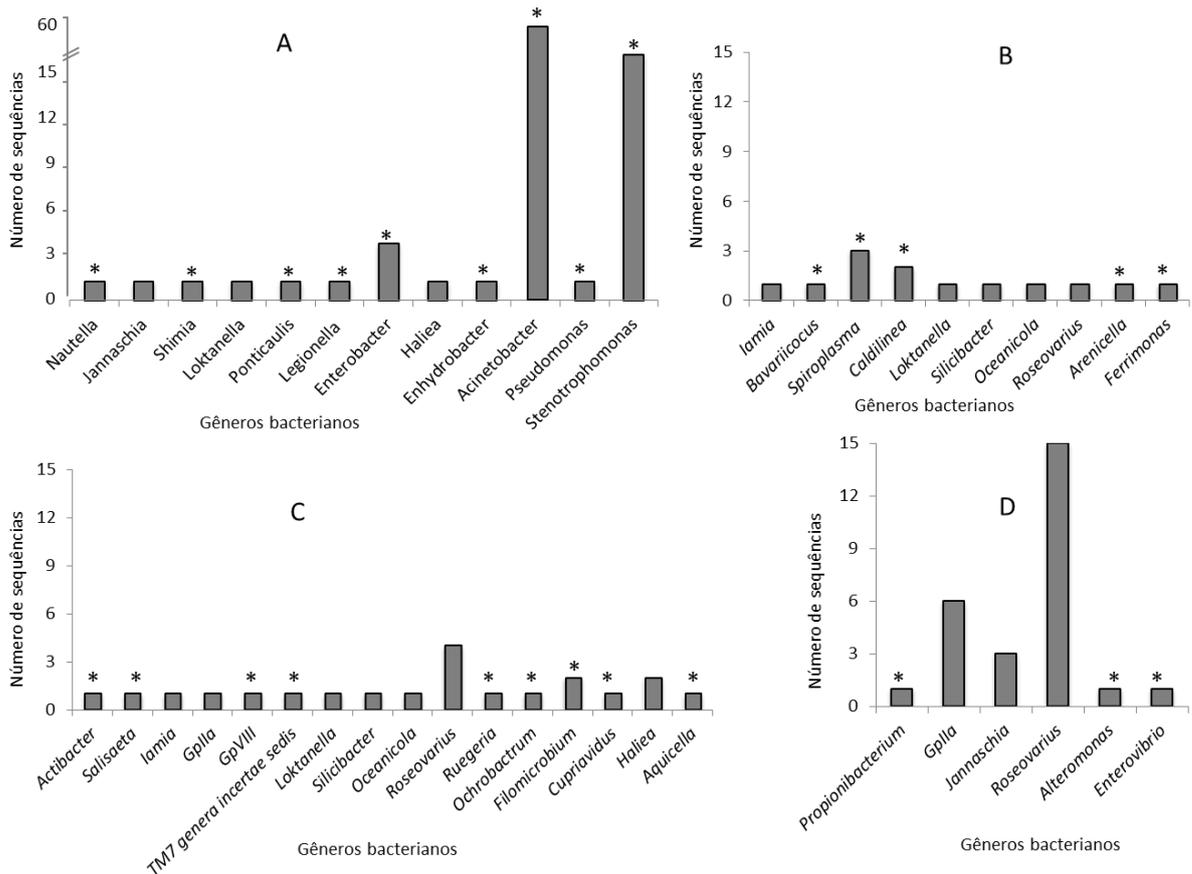
Tabela 5: Táxons bacterianos identificados na água do mar. O símbolo * indica táxon exclusivo. Nc: não classificada.

Filo	Classe	Família	Gênero
Bacteriodetes	-	Flammeovirgaceae	nc
Actinobacteria	-	Propionibactériaceae	<i>Propionibacterium</i> *
Cyanobacteria	-	Família II	<i>GpIIa</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Jannaschia</i>
Proteobacteria	α	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i>
Proteobacteria	γ	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i> *
Proteobacteria	γ	Vibrionaceae	<i>Enterovibrio</i> *

A figura 13 revela que, apesar da grande diversidade de gêneros, poucos foram dominantes em relação à abundância. *Palythoa caribaeorum* apresentou a dominância apenas

do gêneros *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* que, como citado anteriormente, foram exclusivos para esse zoantídeo. *Z. sociatus* e *P. variabilis* não apresentaram gêneros dominantes. A amostra da água do mar a apresentou dois gêneros mais dominantes: *Gp11a* e *Roseovarius*.

Figura 13: Abundância dos gêneros nas amostras de zoantídeos e água do mar. A: *Palythoa caribaeorum*, B: *Protopalythoa variabilis*; C: *Zoanthus sociatus*; D: Água do Mar. O símbolo * acima das barras indica os gêneros exclusivos.



A tabela 6 mostra a equabilidade e os valores dos índices de diversidade alfa dos gêneros bacterianos presentes nas amostras de zoantídeos e água do mar.

Tabela 6: Riqueza, equabilidade e índices de diversidade de gêneros bacterianos associados aos zoantídeos e água do mar.

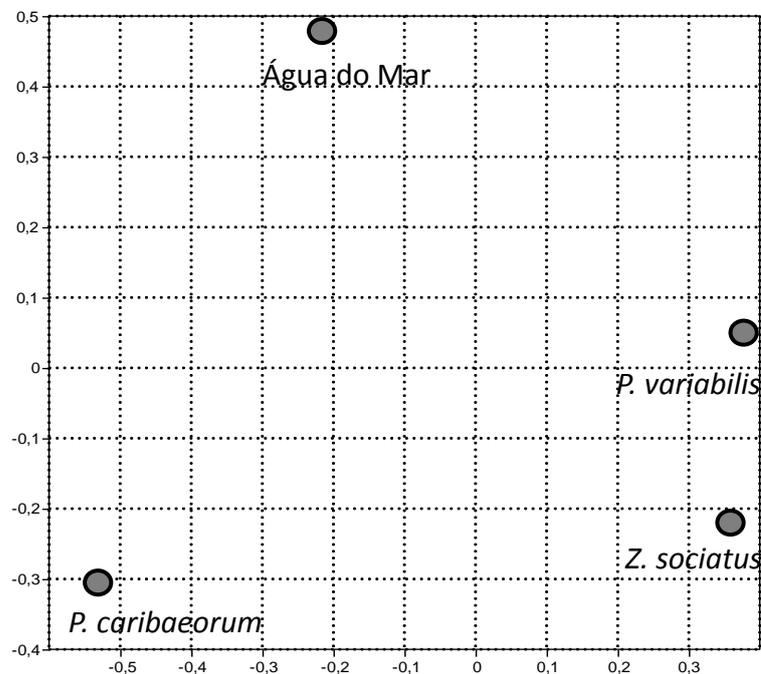
Amostras	Riqueza	Equabilidade	Shannon	Simpson (1-D)
<i>Palythoa caribaeorum</i>	13	0,4682 ^{†*}	1,201 ^{†*}	0,5011 ^{†*} ψ
<i>Zoanthus sociatus</i>	10	0,9826 [†]	2,043 [†]	0,8642 [†]
<i>Protopalythoa variabilis</i>	16	0,9552 ^{*x}	2,648 ^{*ψ}	0,9161 ^{*x}
Água do Mar	7	0,7091 ^x	1,380 ^ψ	0,6505 ^{ψx}

†* ψ x símbolos representam diferenças significativas entre as amostras (P ≤ 0,05). Para o índice calculado, a presença do mesmo símbolo em diferentes amostras indica que as mesmas são estatisticamente diferentes.

Apesar da riqueza dos gêneros bacterianos associados à *P. caribaeorum* ter sido maior que a riqueza de bactérias encontradas em *Z. sociatus*, sua equabilidade foi menor, o que pode, baseado nos índices de diversidade calculados, refletir em uma menor diversidade. Os resultados revelaram que não ocorreram bactérias dominantes em *Z. sociatus* e *P. variabilis*. A comunidade bacteriana para esses zoantídeos apresentaram a distribuição da abundância relativa mais homogênea, conferindo maiores valores de equabilidade. Associada aos dados de riqueza, a maior equabilidade de *P. variabilis* e *Z. sociatus* gerou uma maior diversidade, como demonstrado pelos três índices de diversidade da tabela 6.

De acordo com os índices de diversidade alfa calculados, pôde-se inferir sobre a similaridade entre as amostras. Levando-se em consideração a riqueza, abundância e equabilidade entre os táxons de bactérias encontrados, os zoantídeos *P. variabilis* e *Z. sociatus*, são mais semelhantes entre si e diferem de *P. caribaeorum* e da água do mar (Figura 14). Esses dados corroboram com os apresentados anteriormente para a DGGE que apontou maior semelhança entre *Z. sociatus* e *P. variabilis*.

Figura 14: Ordenação não métrica (NMDS) das amostras de zoantídeos e água do mar.



Os resultados das análises de similaridade de Jaccard demonstraram baixos valores de índice (<27%) entre as espécies de zoantídeos e a água do mar, indicando que cada espécie de zoantídeo apresentou uma composição de bactérias distinta. Entretanto, quando considerada

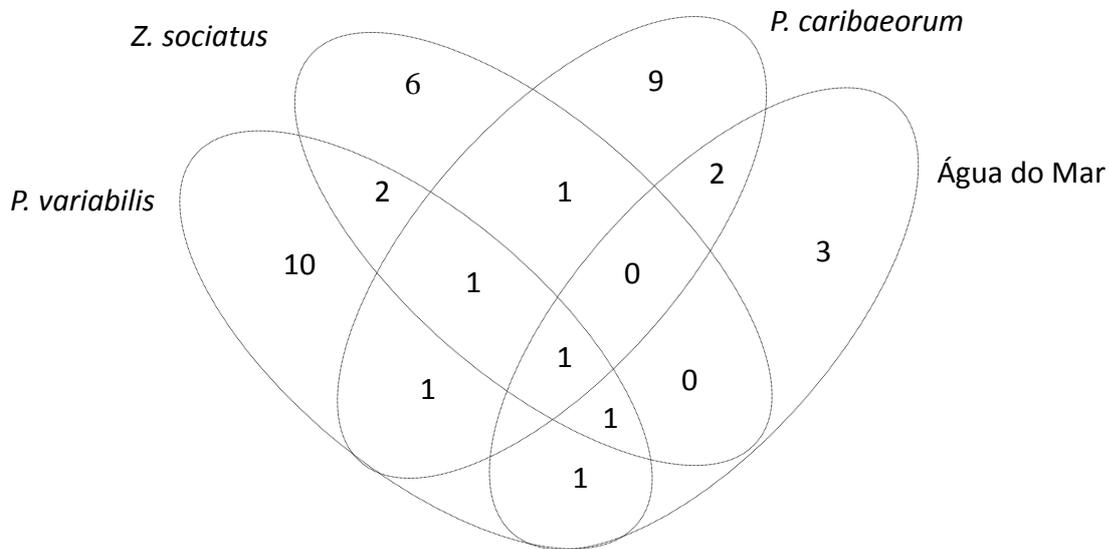
a abundância relativa dos gêneros de bactérias de cada espécie de zoantídeo (índice de Morisita-Horn), *P. variabilis* foi mais similar à água do mar do que as demais espécies de zoantídeo. Ainda, *P. caribaeorum* apresentou valores menores de similaridade em relação às demais espécies de zoantídeos, indicando que a composição de gêneros de bactérias foi mais distinta para essa espécie. Os índices de diversidade beta são mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Índices de Jaccard (matriz triangular inferior) e Morisita-Horn (matriz triangular superior) calculados para as amostras de zoantídeos e água do mar.

	<i>P. caribaeorum</i>	<i>Z. sociatus</i>	<i>P. variabilis</i>	Água do Mar
<i>P. caribaeorum</i>	-	0,013	0,007	0,008
<i>Z. sociatus</i>	0,115	-	0,3765	0,339
<i>P. variabilis</i>	0,090	0,269	-	0,549
Água do Mar	0,136	0,100	0,160	-

Fazendo a comparação entre os táxons compartilhados, observou-se que um táxon (gênero *Loktanella*) foi exclusivo apenas para as espécies de zoantídeos, sendo ausente na água do mar, enquanto outros foram compartilhados em uma das espécies de zoantídeo e na água, como por exemplo, *Gplla* (filo Cyanobacteria) que ocorreu na água e em *P. variabilis* e *Jannaschia*, que foi detectada em *P. caribaeorum* e na água. Somente 1 táxon (família Flavobacteriaceae, a qual não pôde ser classificada no nível de gênero) foi comum a todas as espécies de zoantídeos e água do mar (Figura 15). Dentre os gêneros compartilhados entre *Z. sociatus* e *P. variabilis* estão os gêneros *Iamia*, *Silicibacter* e *Oceanicola*. A figura 15 sumariza a quantidade de gêneros compartilhados e exclusivos nas amostras.

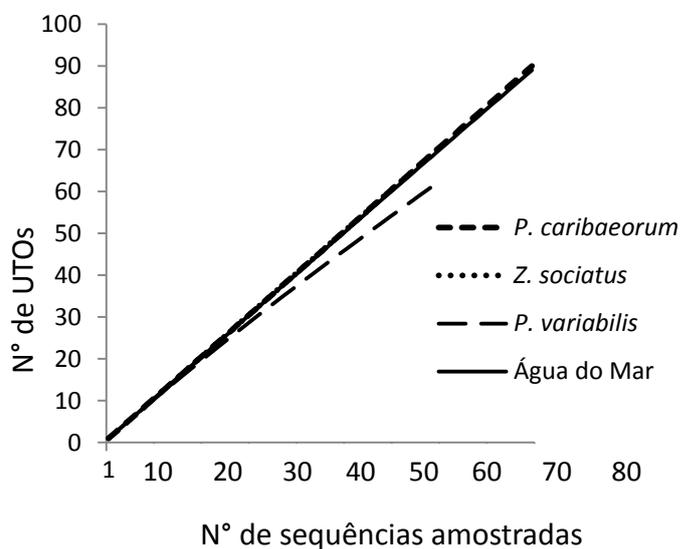
Figura 15: Diagrama de Venn baseado nas UTOs bacterianas únicas e compartilhadas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.



Esses resultados denotam que há uma diversidade de gêneros bacterianos bem definida e típica sobrevivendo no habitat conferido pelos zoantídeos. Esses resultados também foram confirmados utilizando o programa S-LIBSHUFF 1.22, onde foi observada uma diferença significativa entre as bibliotecas, apresentando um valor de $P = 0,001$ para um intervalo de confiança de 95%.

As curvas de rarefação ficaram longe de alcançar a assíntota da curva, tendendo a um aclave, indicando que o número de sequências analisadas não cobriu completamente a riqueza de filotipos das comunidades bacterianas (Figura 16).

Figura 16: Curvas de rarefação obtidas pelo MOTHUR para as bibliotecas de RNAr 16S de zoantídeos e água do mar.



Adicionalmente, as sequências foram classificadas usando a ferramenta BLAST para uma afiliação filogenética mais detalhada. As tabelas A, B, C e D (APÊNDICE) apresentam a classificação obtida no NCBI, juntamente com as classificadas no RDP, para as bibliotecas de *P. caribaeorum*, *Z. sociatus*, *P. variabilis* e água do mar, respectivamente. Muitas UTOs foram classificadas pelo NCBI como bactérias não cultivadas. As tabelas apresentam a classificação das sequências ao menor nível taxonômico possível gerado pelo RDP, e foram consideradas apenas as classificações que atingiram, pelo menos, 80% de confiabilidade.

No geral, as sequências obtidas foram afiliadas a clones de bactérias encontradas em vários ambientes, como bactérias associadas a diversas espécies de invertebrados marinhos, águas oceânicas a sedimentos marinhos e estuarinos, evidenciando que as mesmas bactérias presentes nos zoantídeos e na água do mar amostrados nesse trabalho estão presentes em vários outros organismos e habitats.

5.DIUSSÃO

Após vasta revisão bibliográfica constatou-se que existem poucos estudos sobre a diversidade bacteriana associada a zoantídeos. Chimetto *et al.* (2008, 2009, 2010) e Lins-de-Barros *et al.* (2007) foram os únicos que estudaram a diversidade de bactérias em zoantídeos no Brasil e, atualmente, a maioria dos dados publicados sobre microbiota associada a cnidários refere-se a corais escleractínios.

5.1 Diversidade e papel das bactérias associadas aos zoantídeos

A estrutura da comunidade bacteriana revelada por DGGE pressupõe que há diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre as amostras. Os resultados revelaram que há um alto grau de especificidade entre a microbiota e seu hospedeiro, com apenas 1 UTO compartilhada entre as amostras e UTOs únicas e exclusivas.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de DGGE, os zoantídeos *P. variabilis* e *Z. sociatus* tiveram maior número de UTOs, evidenciando a maior riqueza bacteriana nessas amostras.

A técnica de DGGE foi utilizada por Bourne e Munn (2005) e Garren *et al.* (2009) para identificação de bactérias associadas a corais. Esses autores discutiram que essa é uma técnica importante na detecção de diferenças entre as comunidades simbiotes de invertebrados, sendo útil para inferir sobre a especificidade entre hospedeiro e simbiote. Essa especificidade ficou clara nos resultados aqui apresentados e foi corroborada pelos dados do sequenciamento do gene RNAr 16S.

Os resultados do sequenciamento do gene RNAr 16S revelaram uma grande diversidade de sequências. Para *P. caribaeorum*, por exemplo, todas as sequências foram classificadas como únicas, sem repetições, o que demonstra a grande variedade de táxons bacterianos existentes nessa amostra (Tabela 1, pág. 56). As outras amostras de zoantídeos também apresentaram grande riqueza de sequências e conseqüentemente grande riqueza de táxons bacterianos, demonstrando a capacidade desses organismos de abrigar bactérias de diferentes grupos.

A identificação das sequências revelou que poucos táxons foram dominantes. Além disso, muitos gêneros bacterianos foram exclusivos, identificados apenas nos zoantídeos e

ausentes na água do mar. Esses dados corroboram com os encontrados por Sunagawa; Woodley; Medina (2010) os quais discutiram que comunidades bacterianas marinhas são comumente compostas por uma grande diversidade de táxons, mas com baixa abundância e poucos táxons dominantes. Além disso, esses autores verificaram que bactérias raras ou ausentes na água do mar foram dominantes em algumas espécies de corais do Caribe, sugerindo que corais provêm um habitat altamente especializado essa microbiota.

A diversidade dos filos e classes bacterianos encontrados nas amostras dos zoantídeos foi semelhante à encontrada por outros autores em várias espécies de corais escleractínios ao redor do mundo (APPRILL et al., 2009; BOURNE; MUNN, 2005; CEH; KEULEN; BOURNE, 2011; GÄRTNER et al., 2011; HUNTER; MILLS; KOSTKA, 2006; KALIMUTHO; AHMAD; KASSIM., 2007; KOOPERMAN et al., 2007; NEULINGER et al., 2008; PACHIADAKI et al., 2011; ROWHER et al., 2002; SUNAGAWA; WOODLEY; MEDINA, 2010). O filo Proteobacteria foi o mais abundante em todas as amostras com a dominância das classes α e γ -Proteobacteria. α -Proteobacteria foi dominante na água do mar e nos zoantídeos *Z. sociatus* e *P. variabilis*. A classe γ -Proteobacteria foi dominante em *P. caribaeorum*.

De acordo com Kooperman et al. (2007) a camada de muco do coral está em constante associação com a coluna de água circundante e as bactérias podem se deslocar a partir da coluna de água para o muco e vice-versa, o que explicaria ribotipos semelhantes no zoantídeos e amostras d'água do mar. Esse fato pode explicar a dominância de α -Proteobacteria nas amostras dos zoantídeos *P. variabilis* e *Z. sociatus* uma vez que esse grupo bacteriano é predominante na água do mar. Esse resultado foi semelhante ao encontrado para o coral brasileiro *Mussismilia braziliensis* onde α -Proteobacteria foi o grupo dominante seguido de γ -Proteobacteria e Cyanobacteria (REIS et al., 2009).

Por outro lado, embora também em contato direto com a água do mar, *P. caribaeorum* parece ser uma espécie de zoantídeo com maior especificidade por bactérias da classe γ -Proteobacteria. Resultado semelhante foi encontrado por Sweet; Croquer; Bythell (2011) os quais compararam a comunidade bacteriana do muco, tecido, e esqueleto do coral *Acropora muricata*, além de identificar a comunidade bacteriana do sedimento e da água do mar. Os autores encontraram a dominância de γ -Proteobacteria no tecido e α -Proteobacteria na água do mar, resultado também encontrado por Bourne e Munn (2005) para o coral *Pocillopora damicornis*. Esse resultado foi corroborado no presente estudo, onde *P. caribaeorum* apresentou dominância de γ -Proteobacteria (principalmente bactérias do gênero

Acinetobacter) em contraste com *Z. Sociatus*, *P. Variabilis* e água do mar, os quais apresentaram dominância de α -Proteobacteria.

Resultado também semelhante ao encontrado em *P. caribaeorum* foi verificado por Santiago-Vázquez *et al.* (2007) que estudaram a comunidade bacteriana do coral negro *Cirrhopathes lutkeni*. Os resultados desses autores revelaram que também houve predominância do filo Proteobacteria, com a classe γ -Proteobacteria a mais abundante seguida por α -Proteobacteria. Para o coral *Montastrea carvernosa* Frias-Lopez *et al.* (2002) descobriram que a classe γ -Proteobacteria também apresentou maior abundância.

Esses dados indicam a alta especificidade ente bactérias e hospedeiro, pois mesmo que o ambiente circundante seja dominado por bactérias de um determinado grupo, algumas espécies de corais apresentam especificidade para os grupos bacterianos raros ou ausentes na água do mar.

Raina *et al.* (2009) verificaram que duas espécies de corais que apresentam colônias adjacentes podem ter diferenças na dominância das classes de bactérias. Por exemplo, há a dominância de γ -Proteobacteria em *Acropora millepora*, enquanto *Montipora aequituberculata*, coletada na mesma região, apresentou dominância de α -Proteobacteria, indicando que, mesmo com colônias próximas ou até mesmo em contato direto no ambiente natural (como no caso dos zoantídeos estudados) cada espécie pode ter especificidade diferente para seus simbiossiontes.

Além das classes α -Proteobacteria e γ -Proteobacteria, as classes δ -Proteobacteria e β -Proteobacteria parecem ser específicas para as espécies de zoantídeos estudadas. Bactérias da classe δ -Proteobacteria foram identificadas somente em *P. caribaeorum* e *Z. sociatus* e β -Proteobacteria foi identificada somente em *P. variabilis*, evidenciando um certo grau de especificidade entre simbiote e hospedeiro.

Fortalecendo a hipótese da especificidade, Ceh; Keulen; Bourne (2011) construíram bibliotecas bacterianas a partir de clones do gene RNAr 16S de três espécies de corais australianos: *Pocillopora damicornis*, *Acropora tenuis* e *Fungia abdita* e encontraram a dominância de α -Proteobacteria em *P. damicornis* (73%), embora essa classe tenha representado apenas 15,9% e 17,3% de abundância em *A. tenuis* e *F. abdita*, respectivamente. Além disso, somente *F. abdita* continha a classe β -Proteobacteria.

O filo Bacteroidetes foi o único que apresentou representantes em todas as amostras. Provavelmente essas bactérias são generalistas, hipótese reforçada por dados das tabelas A-D

(APÊNDICE) que mostram resultados de pesquisas que identificaram esse filo tanto na forma livre como em simbiose com diversos invertebrados.

O filo Actinobacteria também esteve presente nas amostras de zoantídeos e água do mar, não ocorrendo apenas em *P. caribaeorum*. Segundo Munn (2004) Actinobacteria é um dos grupos mais comuns em ambiente marinho. Menezes *et al.* (2010) discutiram que membros do filo Actinobacteria têm considerável valor como produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos, tais como antibióticos e outros compostos terapêuticos, além da capacidade de produção de diversas enzimas e proteínas (SURAJIT; WARD; BURKE, 2008) o que pode ser de fundamental importância para a sobrevivência do seu hospedeiro. A presença dessas bactérias nos tecidos dos zoantídeos provavelmente confere alguma vantagem aos hospedeiros, principalmente em relação à defesa contra bactérias patogênicas. Rohwer *et al.* (2002) e Rypien; Ward; Azam (2010) discutiram que bactérias produtoras de antibióticos atuam de maneira antagonista com a produção de antibióticos frente à bactérias potencialmente patogênicas para o coral ou através da ocupação física do espaço e/ou competição por nutrientes com bactérias não residentes.

Em relação ao Filo Cyanobacteria, Munn (2004) discute que bactérias desse grupo são conhecidas como as maiores contribuintes na produtividade primária dos oceanos, além de atuarem na fixação do nitrogênio. A presença desse filo em zoantídeos leva a crer que, provavelmente, essas bactérias beneficiam seu hospedeiro através da assimilação de nitrogênio, utilizado para o metabolismo do coral, bem como a translocação e aproveitamento do excesso de carbono proveniente da fotossíntese.

Os filos Tenericutes e Chloroflexi, que ocorreram apenas em *Z. sociatus*, foram identificados também em sedimento marinho por Mills; Huntrier; Humphrys (2008). Esses autores utilizaram marcadores moleculares específicos e relacionaram membros do filo Chloroflexi ao processo de nitrificação e desnitrificação, sendo importantes no ciclo do nitrogênio dos oceanos. O Filo também foi encontrado em associação simbiótica com larvas de esponjas (WEBSTER *et al.*, 2011) e em corais escleractínios coletados na Noruega (NEULINGER *et al.*, 2008).

Mills; Huntrier; Humphrys (2008) discutiram que o filo Firmicutes (encontrado em *Z. sociatus* e *P. variabilis*), também está relacionado ao ciclo do nitrogênio, pois apresentam genes relacionados aos processos de nitrificação e desnitrificação.

O filo TM7 (exclusivo para *P. variabilis*) foi encontrado por Neulinger *et al.* (2008) no coral *Lophelia pertusa* e em simbiose com a esponja *Chondrilla nucula* (THIEL *et al.*, 2007), sugerindo que esse filo pode ser comum em associações com invertebrados. Não há dados na literatura que apontem o papel biológico de bactérias desse filo, contudo, a sobrevivência delas em tecidos de invertebrados provavelmente deve conferir alguma vantagem para esses micro-organismos.

Assim, embora no presente estudo tenham encontrados exclusivamente em zoantídeos, dados pretéritos revelam que esses filios são comuns em amostras ambientais e em associação com outros invertebrados.

O sequenciamento do gene RNAr 16S revelou um resultado semelhante ao encontrado através da técnica de DGGE ou seja, maior diversidade de bactérias em *Z. sociatus* e *P. variabilis*. Apesar da riqueza de *P. caribaeorum* ter sido maior que a de *Z. sociatus* (Tabela 6, pág. 60) sua equabilidade foi menor, o que pode, baseado nos índices de diversidade calculados, refletir em uma menor diversidade. A equitatividade foi maior para *Z. sociatus* e *P. variabilis* que não apresentaram gêneros bacterianos dominantes, tendo a distribuição das abundâncias dos gêneros mais uniforme. Associada aos dados de riqueza, a maior equitatividade de *P. variabilis* e *Z. sociatus* gerou uma maior diversidade de Shannon, como demonstrado na tabela 6. Os resultados corroboraram com o índice de Simpson, que também mostrou maior diversidade para esses zoantídeos.

Os índices de Jaccard e Morisita revelaram que há uma baixa similaridade entre a comunidade bacteriana dos zoantídeos. Resumidamente, a baixa similaridade observada entre os zoantídeos indica que a diversidade beta de bactérias é elevada, em parte pela aparente especificidade das bactérias por determinadas espécies de hospedeiro. Do ponto de vista de conservação essas informações são muito importantes e precisam ser consideradas.

As diferenças na diversidade bacteriana entre as amostras demonstram que cada espécie de zoantídeo tem seu conjunto de simbiontes específico o qual difere das bactérias da água do mar. A seleção de bactérias simbiontes é um fenômeno ainda pouco estudado, sendo necessárias pesquisas que abordem, a nível bioquímico, os mecanismos de reconhecimento e seleção de bactérias pelos seus hospedeiros.

No entanto, a explicação mais plausível para as diferenças na composição das bactérias entre as espécies de zoantídeos é que cada hospedeiro tem seu requerimento nutricional específico, bem como necessidades intrínsecas de certos compostos produzidos

por seus simbioses e, ao longo da evolução do holobionte, esses animais selecionaram algumas bactérias e se adaptaram a um conjunto característico desses micro-organismos que mais lhes conferem vantagens. Além disso, as propriedades do muco produzido por cada espécie de zoantídeo poderia servir como meio de cultura específico para determinados grupos bacterianos. Tem sido sugerido que o muco de diferentes espécies de corais são enriquecidos de maneira diferente, favorecendo o crescimento de determinadas comunidades bacterianas e beneficiando alguns grupos de bactérias adaptadas às condições específicas daquele meio (RICHIE; SMITH, 1995). Outra explicação é que, não somente os corais selecionam as bactérias que abrigarão em seus tecidos, mas as bactérias também podem selecionar as espécies de hospedeiros que mais lhes confere vantagens, sugerindo uma co-evolução. Entretanto, somente estudos detalhados de filogenia e biogeografia entre hospedeiros e simbioses poderiam responder a essas questões.

Foi discutido anteriormente que os filos bacterianos foram diversos e muitos deles e maneira geral, a maioria dos gêneros bacterianos identificados foi detectada apenas em uma das espécies de zoantídeo ou água do mar amostrados.

A classe γ -Proteobacteria, dominante em *P. caribaeorum* apresentou muitos gêneros exclusivamente identificados nesse zoantídeo, dentre eles o gênero *Acinetobacter* o qual, interessantemente, foi um dos mais abundantes nesse zoantídeo. Mason *et al.* (2010) relataram esses gêneros em rochas da crosta oceânica e verificaram a presença de genes funcionais em *Acinetobacter* relacionados à degradação de hidrocarbonetos. Segundo os mesmos autores, muitas bactérias marinhas têm genes que codificam para respiração anaeróbia, o que os permite sobreviver em grandes profundidades através da redução de nitrato e sulfato. Raina *et al.* (2009) discutiram sobre o papel de bactérias do gênero *Pseudomonas* presentes nos corais *Acropora millepora* e *Montipora aequituberculata* no ciclo do enxofre, indicando que bactérias desse gênero atuam nos ciclos biogeoquímicos dos oceanos e, quando simbioses, podem atuar beneficiando os corais na assimilação de compostos inorgânicos.

Curiosamente, Shnit-Orland e Kushmaro (2009) isolaram bactérias com intuito de conhecer a capacidade de produção de antibióticos e constataram que 89,5% dos gêneros bacterianos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana pertenciam à classe γ -Proteobacteria, o que pode estar relacionado ao papel de defesa contra patógenos.

O gênero *Stenotropomonas* (também pertencente à classe γ -Proteobacteria), foi outro gênero exclusivo para *P. caribaeorum* e também associado à produção de substâncias com atividade antimicrobiana. Segundo Minkwitz e Berg (2001), *Stenotropomonas* é um grupo bacteriano conhecido por produzir antibióticos, proteases e quitinases. A presença dessas bactérias em zoantídeos provavelmente contribui na defesa contra micro-organismos patogênicos e na alimentação do hospedeiro, auxiliando na digestão de presas com contêm quitina em sua composição.

Dessa forma, a presença de bactérias relacionadas àquelas capazes de degradar hidrocarbonetos, fixar nitrogênio, metabolizar enxofre e produzir enzimas e substâncias com atividade antimicrobiana sugere que o zoantídeo *P. caribaeorum* abriga uma comunidade microbiana que o beneficia através da assimilação de compostos usados em seu metabolismo, provavelmente contribuindo com os ciclos biogeoquímicos dos oceanos, além de possivelmente defender o hospedeiro contra patógenos e auxiliando na sua alimentação.

Os gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* também foram identificados em várias espécies de corais de diferentes regiões do mundo (KALIMUTHO; AHMAD; KASSIM, 2007; LUNA *et al.*, 2010; SANTIAGO-VÁZQUEZ *et al.*, 2007; SEKAR *et al.*, 2006) e em ascídias (MENEZES *et al.*, 2010; MEZITI *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2010). A presença desses gêneros em zoantídeos e em vários grupos de invertebrados, como citado na literatura, sugere que esses gêneros são generalistas e capazes de sobreviver sob diferentes situações ambientais.

O gênero *Acinetobacter* é conhecido por sua resistência a antibióticos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996) e pelo seu potencial em aplicações biotecnológicas como biodegradação e biorremediação, engenharia enzimática e produção de biosurfactantes e biopolímeros (CARVALHO; FERNANDES, 2010). Nesse sentido, devido à grande abundância de *Acinetobacter* em *P. caribaeorum*, esse zoantídeo poderia ser usado como fonte promissora de bactérias para pesquisas sobre as aplicações biotecnológicas de *Acinetobacter*.

A presença de bactérias relacionadas à produção de diferentes compostos nos tecidos de *P. caribaeorum* provavelmente pode estar relacionada à sua conhecida capacidade de produção de toxinas. Inclusive, o grande interesse em estudos de corais moles, principalmente membros do gênero *Palythoa*, deve-se à produção dessas toxinas químicas, conhecidas como palytoxinas, as quais são de considerável interesse por suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Essa toxina é considerada a molécula biologicamente ativa de origem marinha mais potente e a mais tóxica conhecida, sendo apenas menos venenosa que a

toxina botulínica (KAUL; FARMER; CIERESZKO, 1974) e especula-se que essa toxina é produzida por microorganismos simbiotes (MOORE; HELFRICH; PATTERSON, 1982; SOARES *et al.*, 2006).

Rabelo (2007) verificou que *P. caribaeorum* foi o zoantídeo que apresentou maior capacidade competitiva frente aos outros zoantídeos estudados em ambiente natural, crescendo entre os pólipos e matando as colônias de *P. variabilis* e inibindo o crescimento de *Z. sociatus*. Provavelmente, essa maior capacidade de competição por espaço deve-se à produção de metabólitos secundários de origem bacteriana. Estudos abordando a genômica funcional de bactérias encontradas em *P. caribaeorum* poderiam ajudar a elucidar o papel dessas bactérias na produção da palytoxina ou de outros compostos de interesse biológico.

Os gêneros de bactérias exclusivos para *Z. sociatus* e *P. variabilis* não apresentaram papel biológico indicado na literatura o que revelam a necessidade de pesquisas envolvendo aspectos da fisiologia dessas bactérias. Essa carência de trabalhos pode ser resultado da dificuldade de cultivo de muitas bactérias em laboratório, sendo necessário o uso de técnicas moleculares que independam do cultivo. De fato, as tabelas B e C (APÊNDICE) mostram que a maioria das bactérias encontradas nesses zoantídeos é classificada como não cultiváveis.

Dentre as bactérias identificadas em *P. variabilis*, apenas bactérias do gênero *Ruegeria*, apresentam papel conhecido na literatura. Essas bactérias são amplamente conhecidas pelo seu potencial para produzir compostos bioativos que são utilizados pelos seus hospedeiros para sua própria defesa (MITOVA *et al.*, 2004; HENTSCHEL *et al.*, 2001), refletindo na importância desse grupo como simbiote.

Embora a maioria dos táxons tenha sido exclusiva para as espécies de zoantídeos e para a água do mar, alguns táxons foram comuns entre as amostras, como os gêneros *Roseovarius*, *Jannaschia*, *Loktanella* e *Silicibacter*.

O gênero *Roseovarius* foi bastante representativo em todas as amostras, exceto em *P. caribaeorum*, onde esse táxon foi ausente. O gênero *Roseovarius* pertence à subclasse Roseobacter (classe α -Proteobacteria) e foi o táxon dominante na água do mar.

Kan *et al.* (2008) estudaram bactérias em amostras de água de estuário discutiram que bactérias do gênero *Roseovarius* são resistentes a variações de salinidade a que o ambiente estuarino está sujeito. Assim, a presença desse gênero em *Z. sociatus* e em *P. variabilis* provavelmente poderia de alguma forma ainda desconhecida auxiliar na resistência desses animais frente às mudanças de salinidade a que o ambiente entre marés está sujeito. Esses

dados corroboram com os resultados de Rabelo (2007) que verificou que *Z. sociatus* e *P. variabilis* são as espécies de zoantídeos mais resistentes à dessecação e aumento de temperatura, e que *P. caribaeorum* apresenta menor resistência. Assim, a presença de bactérias do gênero *Roseovarius* em *Z. sociatus* e *P. variabilis* pode estar, dentre outros fatores, relacionada à maior resistência desses zoantídeos a fatores ambientais adversos.

Buchan; Moran (2005) afirmam que o gênero *Roseovarius* (um dos cinco gêneros pertencentes à subclasse Roseobacter) e é um dos maiores grupos de bactérias de ambiente marinho. Além disso, os membros desse clado podem ser encontrados na forma livre, compondo o bacterioplâncton ou mantendo relações de simbiose com invertebrados e vertebrados (ALLGAIER *et al.*, 2003). Baseado em estudo moleculares usando o gene RNAr 16S, o grupo tem sido identificado em muitos ambientes marinhos, sendo prevalente na água do mar e sedimento de vários ambientes marinhos do Pacífico (SCHMIDT; DELONG; PACE, 1991), Mediterrâneo (BENLLOCH; RODRÍGUEZ-VALERA; MARTINEZ-MURCIA, 1995), Caribe (FRIAS-LOPES *et al.*, 2002) e Atlântico Norte (FUHRMAN; OUVENEY, 1998). Não há registros desse gênero para águas do Atlântico Sul, nem como bactérias de vida livre nem como simbioses.

O gênero *Roseovarius* é conhecido por sua capacidade de produzir metabólitos secundários que são utilizados para sinalização química e defesa do hospedeiro (BRINKHOFF; BACH; HEIDORN, 2004). Nissimov; Rosenberg; Munn (2009) verificaram que a incubação das bactérias do gênero *Roseobacter* contra *Vibrio shiloi* (bactéria relacionada à doenças em corais) levou a uma redução da contagem desses patógenos viáveis em apenas 3 horas, reforçando o conceito de um efeito probiótico de certas espécies de bactérias associadas aos corais.

Ressalta-se ainda que essas bactérias são extremamente importantes em ambientes marinhos planctônicos pelo seu papel crítico no ciclo do carbono e nitrogênio do oceano (KOLBER *et al.*, 2001).

González; Kiene; Moran (1999) e González *et al.* (2000) discutiram sobre o papel de *Roseobacter* na degradação de Dimetilsulfoniopropionato (DSMP) em dimetilsulfido (DMS). O DMS degradado pelas bactérias é oxidado na atmosfera em ácido sulfúrico e ácido metanosulfônico, dois componentes químicos que atraem moléculas de água influenciando o clima global através do seu efeito na formação de nuvens. Raina *et al.* (2009) confirmaram a importância de *Roseobacter* no ciclo do enxofre, encontrando bactérias desse grupo em

associação com corais. Além disso, Apprill *et al.* (2009) discutiram que é possível que bactérias do clado Roseobacter associadas a corais podem ser atraídas pela disponibilidade de DMSP o qual é produzido por zooxantelas simbiotes. Acredita-se assim que o DMSP, produzido pelas zooxantelas, atraia novas bactérias que colonizarão os tecidos do hospedeiro.

Além de atuar no ciclo do enxofre, bactérias do clado Roseobacter apresentam atividade bactericida contra muitos patógenos de peixes e invertebrados (HJELM; BERGH; RIAZA, 2004) e, interessantemente, um dos antibióticos produzidos por Roseobacter pode ser derivado da degradação de DMSP por essas bactérias (WAGNER-DÖBLER; RHEIMS; FELSKÉ, 2004).

A associação dessas bactérias com zoantídeos e seu potencial para produzir compostos bioativos pressupõe que bactérias da subclasse Roseobacter é potencialmente importante para a saúde desses animais, confirmando o importante papel dos simbiotes na sobrevivência de seu hospedeiro e na manutenção do equilíbrio dos oceanos.

O gênero *Loktanella* também é conhecido pela produção de metabólitos secundários, dentre eles terpenos, embora seu papel na fisiologia da bactéria seja desconhecido (CARVALHO; FERNANDES, 2010). Outros táxons que foram comuns entre amostras foram bactérias pertencentes ao filo Cyanobacteria, indicando que cianobactérias podem ocorrer não somente na forma livre, mas também em associações com hospedeiros invertebrados, contribuindo na assimilação de carbono pelo hospedeiro através da fotossíntese da bactéria simbiote.

Embora Chimetto *et al.* (2008) tenham identificado bactérias do gênero *Vibrio* em zoantídeos coletados em São Paulo, esse gênero não foi detectado na presente pesquisa. Mais tarde, Chimetto *et al.* (2010) encontraram bactérias do gênero *Photobacterium* em colônias de *P. caribaeorum*. Esse gênero também não foi detectado nos zoantídeos na presente pesquisa. Os resultados desses autores e os apresentados na presente pesquisa indicam que a mesma espécie de zoantídeo pode apresentar diferenças na composição de suas bactérias simbiotes, provavelmente em resposta às características ambientais de cada região.

Com base nos resultados apresentados, sugere-se que a maioria das bactérias encontradas nos zoantídeos está relacionada aos ciclos biogeoquímicos dos oceanos e à produção de compostos biologicamente ativos. Baseado nesse fato, bactérias associadas aos zoantídeos poderiam servir como um recurso em potencial para o isolamento de compostos

bioativos, podendo ser usadas como fontes promissoras para a pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas.

Recentes pesquisas têm demonstrado o potencial de zoantídeos na indústria farmacológica. Wilke *et al.* (2009) analisou o potencial de substâncias obtidas de zoantídeos coletados na costa cearense e concluiu que esses animais são uma fonte de compostos com potencial farmacológico. Assim, a pesquisa com esses animais tende a aumentar muito o conhecimento sobre o potencial biotecnológico desses animais, evidenciando que a resposta para muitos dos nossos problemas está na natureza, embora o homem hesite em preservá-la.

Além da importância biotecnológica, pesquisas envolvendo a diversidade de bactérias simbiotes podem ser importantes na detecção de doenças em corais, funcionando como bioindicadoras. Sekar *et al.* (2006) compararam a comunidade bacteriana de colônias de *Siderastrea siderea* sadias e acometidas com a doença da banda negra (BBD) e verificaram que a composição da comunidade microbiana era diferente entre as amostras. As colônias sadias eram dominadas por γ -Proteobacteria, seguido de β -Proteobacteria e α -Proteobacteria, em contraste, as colônias com BBD eram dominadas por α -Proteobacteria seguida δ -Proteobacteria, Bacteriodetes, Firmicutes e Cyanobacteria, evidenciando que corais podem mudar a composição da comunidade bacteriana frente a uma doença. Nesse sentido, a informação sobre a diversidade da microbiota de corais saudáveis pode ser útil para detectar doenças em corais, muitas vezes não detectadas visualmente.

5.2 Mas, de onde os zoantídeos adquiriram as bactérias simbiotes?

A detecção de táxons ausentes na amostra de água e ao mesmo tempo presentes nos zoantídeos gerou um questionamento: Se muitas bactérias foram únicas para cada espécie de zoantídeo e as mesmas não foram encontradas na água do mar, de onde os hospedeiros adquiriram esses simbiotes? Nesse caso, a hipótese da transmissão horizontal das bactérias, ou seja, a partir do ambiente circundante deve ser refutada?

Pesquisas prévias sugerem que a comunidade bacteriana em corais é distinta daquela que habitam a água do mar circundante (BOURNE; MUNN, 2005; FRIAS-LOPEZ *et al.*, 2002) e praticamente não há sobreposição de ribotipos bacterianos com poucas bactérias sendo compartilhadas entre aos corais e água (FRIAS-LOPEZ *et al.*, 2002). Por outro lado, de acordo com Sunagawa; Woodley; Medina (2010) os corais podem adquirir bactérias espécie-

específicas raras a partir do ambiente sem a necessidade de qualquer modo de transmissão vertical. Nesse caso os corais podem representar habitats especializados para bactérias raras nos quais os micro-organismos têm evoluído ao longo de gerações levando ao benefício mútuo característico dessas associações.

De fato, Aprill *et al.* (2009) excluíram a possibilidade de transmissão vertical de bactérias raras na água em *Pocillopora meandrina*, o que leva a crer que alguns corais necessitam somente da transmissão horizontal como alternativa para aquisição dos seus simbiontes bacterianos ao longo de sua vida.

As bactérias encontradas somente nos zoantídeos e ausentes na água do mar circundante foram as bactérias dos filos Chloroflexi, Firmicutes, Tenericutes, TM7 e algumas bactérias das classes α -Proteobacteria e γ -Proteobacteria, além de todas as bactérias das classes β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria identificadas nessa pesquisa.

Bactérias do filo TM7, Chloroflexi e Tenericutes foram exclusivos para apenas uma espécie de zoantídeo amostrada e, embora tenham sido detectadas por outros autores em vários ambientes e hospedeiros (Tabelas A-D, APÊNDICE), provavelmente essas bactérias colonizam os zoantídeos através da transmissão vertical, uma vez que estavam ausentes na água do mar amostrada naquele momento.

Ressalta-se ainda que a ausência de membros da classe γ -Proteobacteria na água do mar amostrada sugere que *P. caribaeorum* provavelmente adquire os membros dessa classe de maneira vertical, via ovos ou durante o brotamento. Sweet; Croquer; Bythell (2011) discutiram que, como o muco está com contato direto com a água do mar circundante, a presença de bactérias semelhantes na água e no muco é esperada. Por outro lado, *P. caribaeorum* parece ter maior especificidade para bactérias que não são abundantes ou ausentes na água circundante adquirindo-as provavelmente por transmissão materna.

De acordo com a tabela A (APÊNDICE) houve grande similaridade entre sequências identificadas como *Acinetobacter* e *Pseudomonas* obtidas das bibliotecas disponíveis no NCBI com bactérias encontradas na água e sedimento marinhos. A tabela revela ainda a alta similaridade entre as bactérias identificadas nessa pesquisa com as bactérias encontradas em simbiose com esponjas, bivalves e cefalópodes.

O gênero *Stenotrophomonas*, outro membro da classe γ -Proteobacteria foi encontrado por outros autores em várias amostras de ambiente marinho. Gärtner *et al.* (2011), por exemplo, encontraram esse gênero em amostras de sedimento. Além disso, o

gênero *Stenotrophomonas* foi identificado na ascídia *Microcosmus* sp. (MEZITI *et al.*, 2007), em *Artemia* spp. (TKAVC *et al.*, 2011) e no coral *Turbinaria mesenterina*.

Os resultados da tabela A (APÊNDICE) indicam que vários gêneros bacterianos pertencentes à classe γ -Proteobacteria e detectados somente em *P. caribaeorum* podem ser encontrados na forma livre, assim como em simbiose com diversos invertebrados, embora não tenham sido encontrados na água da área de estudo. Provavelmente, para o ambiente estudado essas bactérias apresentam simbiose obrigatória, não sendo aptas a sobreviver fora de seus hospedeiros. Entretanto, dados de várias pesquisas sugerem que esse grupo bacteriano é comum em outros invertebrados, os quais provavelmente adquiriram essas bactérias do ambiente circundante, contrariando a hipótese de transmissão vertical das bactérias da classe γ -Proteobacteria proposta nesta pesquisa.

Alguns membros da classe α -Proteobacteria foram também exclusivamente encontrados em zoantídeos, embora tenham sido identificadas por outros autores em amostras ambientais como água do mar, água de estuário, sedimento marinho e em simbiose com várias espécies de invertebrados (Tabelas A-D, APÊNDICE).

A partir desses dados, conclui-se que muitas bactérias encontradas nos zoantídeos são encontradas também em diversos outros ambientes e hospedeiros. Essas informações corroboram com a hipótese da transmissão horizontal, uma vez que as bactérias exclusivas nos zoantídeos também foram encontradas por outros autores em várias amostras de água do mar, sedimento marinho e estuarino e em vários outros invertebrados. Esses dados sugerem uma distribuição global desses gêneros nos oceanos e em diferentes ambientes e hospedeiros. Entretanto, a ausência desses gêneros na água amostrada pressupõe que a transmissão pode ter sido de maneira vertical.

A partir desses dados, três hipóteses podem ser levantadas para explicar a presença de bactérias exclusivas nos zoantídeos e ausentes na água do mar: 1) As bactérias presentes nos zoantídeos podem estar dispersas e diluídas na água do mar e não puderam ser coletadas através da amostragem realizada; 2) essas bactérias são raras na água do mar circundante aos corais e não puderam ser detectadas pelas técnicas de identificação molecular empregadas e 3)Essas bactérias são ausentes na água do mar e foram transmitidas de geração a geração através dos ovos ou durante a reprodução assexuada. Nesse ultimo caso, provavelmente essas bactérias perderam a habilidade de viver independentemente de seu hospedeiro e passaram a ser transmitidas exclusivamente de maneira vertical.

Embora a maioria das bactérias tenha sido detectada somente nos zoantídeos sugerindo a transmissão vertical, algumas bactérias foram compartilhadas entre os zoantídeos e a água do mar, como as pertencentes aos filos Bacteroidetes, Actinobacteria e Cyanobacteria. Sweet; Croquer; Bythell (2011) encontraram o filo Bacteroidetes em amostras de corais e relataram que esse filo é comumente encontrado também em água do mar. Segundo esses autores, essas bactérias são temporariamente aprisionadas no muco do coral, podendo ser transitórias no hospedeiro. De fato, no presente estudo, bactérias do filo Bacteroidetes estavam presentes em todas as amostras de zoantídeos e na água do mar, sendo o táxon mais abundante na água (Figura 12, pág. 57).

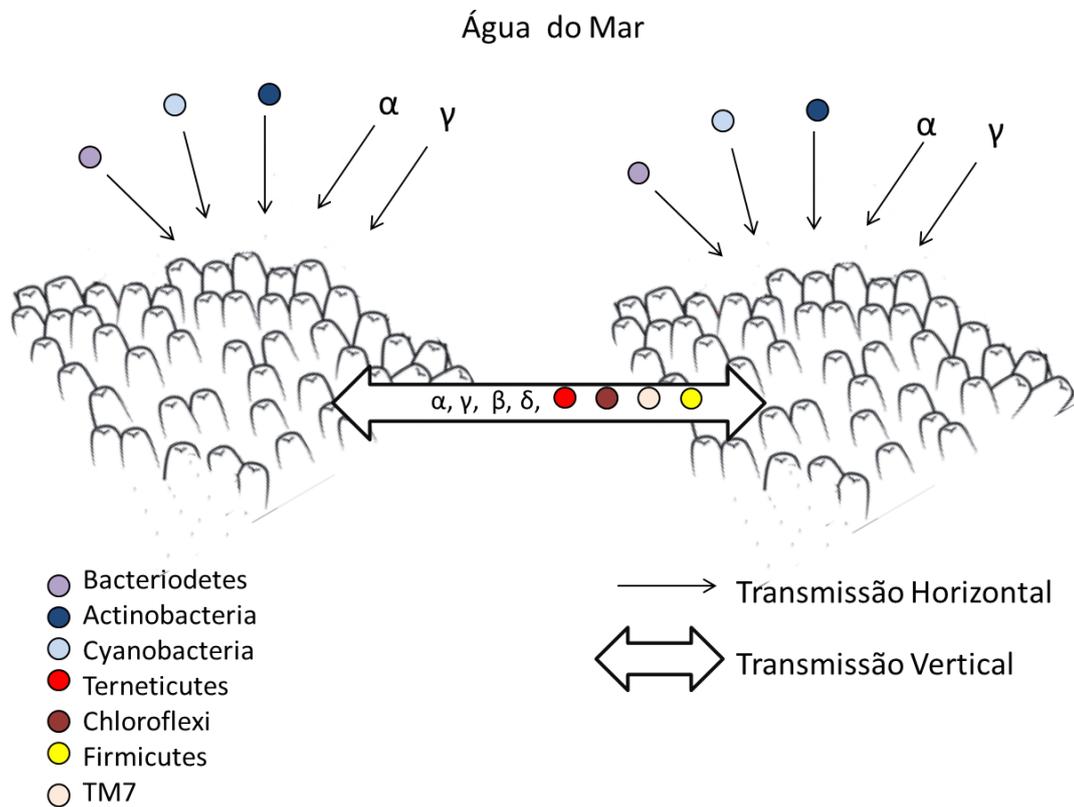
Bactérias do filo Cyanobacteria foram identificadas em todas as amostras de zoantídeos e água do mar e informações de outros autores confirmaram a presença de cianobactérias de vida livre e em associação com vários invertebrados (tabela A-D, APÊNDICE).

De posse dessas informações sugere-se que as bactérias dos filos Bacteroidetes, Actinobacteria e Cyanobacteria são, provavelmente, adquiridas pelos zoantídeos por transmissão horizontal a partir da água circundante.

A suposição de que essas bactérias foram adquiridas através do ambiente (água do mar e/ou sedimento) não exclui a possibilidade de que algumas dessas bactérias sejam também transmitidas verticalmente através dos gametas ou diretamente, durante o brotamento. Estudos detalhados envolvendo gametas e larvas dos zoantídeos e acompanhamento de seu comportamento em laboratório poderiam elucidar a real maneira de transmissão dessas bactérias tão importantes na sobrevivência dos corais.

A figura 17 sintetiza as prováveis formas de transmissão dos diferentes grupos bacterianos sugeridas pela presente pesquisa.

Figura 17: Prováveis formas de transmissão dos diferentes grupos bacterianos identificados nos zoantídeos. Os símbolos α , γ , β e δ representam as classes α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria, respectivamente.



A ausência de algumas bactérias encontradas exclusivamente nos zoantídeos não exclui a possibilidade da existência desses táxons bacterianos na água marinha da área amostrada. De fato, Rosenberg *et al.* (2007) afirmam que a água do mar em volta dos corais pode conter de 100 a 1000 vezes menos bactérias do muco dos corais o que dificultara o acesso à real diversidade bacteriana. Provavelmente, um maior esforço amostral com a coleta de maior quantidade de água representaria melhor a comunidade bacteriana da água marinha do local. As curvas de rarefação (figura 16, pág. 63), entretanto, apontam que não somente a água do mar, mas também uma melhor amostragem dos zoantídeos é necessária, para uma melhor cobertura da real diversidade bacteriana do local.

No entanto, mesmo com todas as limitações da técnica empregada, esses dados são suficientes para mostrar a grande diversidade bacteriana presente nos zoantídeos, gerando dados importantes, até então ausentes na literatura científica.

Esse estudo aponta ainda que, de acordo com os dados da literatura levantados, algumas bactérias simbiotes identificadas parecem ser geograficamente bem distribuídas em diferentes ambientes e em diferentes hospedeiros, sugerindo que essas bactérias se comportam, provavelmente, como generalistas.

Um dado interessante levantado pela pesquisa da similaridade entre os táxons aqui identificados e as sequências depositadas em bancos de dados, revelou que há muitas espécies de bactérias não cultiváveis e não classificadas, com prováveis novos gêneros ou até grupos taxonômicos mais elevados, o que reflete na necessidade de mais estudos relacionados à identificação desses táxons.

O fato de algumas bactérias presentes nos zoantídeos serem também encontradas em amostras ambientais como água do mar, sedimento e tecido de vários invertebrados, levanta a hipótese de que essas bactérias apresentam um mutualismo não obrigatório. A colonização de tecidos animais não parece ser obrigatória para a sobrevivência desses micro-organismos.

Importante ressaltar que essa pesquisa revelou dados inéditos sobre a microbiota bacteriana de três espécies de zoantídeos, preenchendo muitas lacunas sobre o conhecimento desses animais abundantes na costa brasileira, embora pobremente estudados. Técnicas mais robustas de metagenômica associadas ao sequenciamento por métodos *high-throughput*, como pirosequenciamento e barcode, poderão futuramente revelar outros detalhes interessantes da simbiose entre zoantídeos e seus simbiotes.

De qualquer modo, perturbações ambientais, como poluição e alterações climáticas poderiam comprometer seriamente a composição de bactérias que estão associadas aos zoantídeos, prejudicando diretamente a fisiologia e sobrevivência desses animais.

Além do benefício ecológico e ambiental discutido aqui, os micro-organismos marinhos são considerados um recurso promissor na busca de novas drogas e cura de doenças, devido a sua enorme diversidade, embora ainda em fase de exploração.

6. CONCLUSÕES

- Os zoantídeos apresentam uma grande diversidade de bactérias associadas e embora altamente diversas poucas bactérias foram dominantes;
- Os zoantídeos apresentam comunidades bacterianas distintas, as quais diferem daquela presente na água do mar circundante;
- Os zoantídeos diferem na diversidade de seus simbiontes bacterianos, com *Zoanthus sociatus* e *Protopalythoa variabilis* apresentando a maior diversidade bacteriana.
- Muitas bactérias associadas aos zoantídeos provavelmente estão relacionadas à assimilação de compostos importantes na sobrevivência do hospedeiro;

CAPÍTULO II

Zooxantelas Associadas a Zoantídeos

1. INTRODUÇÃO

Protozoários dinoflagelados são comuns e abundantes em ambientes aquáticos, podendo ser fotossintetizantes ou heterótrofos e são particularmente diversos no plâncton marinho, com algumas espécies exclusivamente tropicais (TAYLOR; HOPPENRATH; SALDARRIAGA, 2008).

Muitos dinoflagelados são de vida livre, mas alguns, como as zooxantelas fotossintetizantes, são dinoflagelados simbiotes. O número de espécies de dinoflagelados marinhos de vida livre foi estimado por Gomez (2005) em 1.500 espécies e cerca de 90% delas são encontradas em ambiente marinho e 10% em água doce (TAYLOR; HOPPENRATH; SALDARRIAGA, 2008).

A distribuição desses protozoários é baseada em zonas, sendo relacionada à temperatura e sistema de correntes. Em oceanos tropicais, por exemplo, os dinoflagelados são o grupo de protistas mais abundante e onde mostram sua maior diversidade (TAYLOR; HOPPENRATH; SALDARRIAGA, 2008).

Desde a década de 50 é reconhecido que diversos invertebrados têm dinoflagelados simbiotes. Em corais, a presença destes simbiotes é relacionada à restrição desses animais a águas rasas e à tendência desses organismos de crescerem em direção à luz (SMALL; ADEY, 2001). Essa simbiose combina organismos heterótrofos (animal hospedeiro) e autótrofos (dinoflagelado simbiote) que contribuem substancialmente para a produtividade primária em ambientes recifais (ROWAN, 1998). A associação simbiótica é muitas vezes obrigatória, mutualista e envolve troca regulada de nutrientes e energia entre as partes (MUSCATINE; PORTER, 1977).

Os dinoflagelados do gênero *Symbiodinium*, conhecidos como zooxantelas, estão entre os micro-organismos eucarióticos mais abundantes encontrados em águas rasas em ambientes marinhos tropicais, além disso, sua habilidade para proliferar e manter densas populações em muitos recifes de coral e em invertebrados que habitam recifes tem resultado na dominância ecológica dos hospedeiros em muitos oceanos (BAKER, 2003; LAJEUNESSE *et al.*, 2009).

Diversas espécies de invertebrados marinhos são hospedeiras de um grupo excepcionalmente diverso de protozoários dinoflagelados do gênero *Symbiodinium* (BAKER, 2003; DIMOND; CARRINGTON, 2008; TOLLER; ROWAN; KNOWTON, 2001)

O gênero *Symbiodinium* forma simbiose com uma variedade de grupos de cnidários, incluindo representantes das classes Anthozoa (como anêmonas, corais, zoantídeos e gorgônias), classe Scyphozoa (como águas-vivas) e Hydrozoa (incluindo indivíduos do gênero *Millepora*) (BAKER, 2003; YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008), além de formar simbiose com moluscos nudibrânquios (BURGHARDT; STEMMERA; WÄGELE, 2008; MOORE; GOSLINER, 2011), bivalves (CARLOS *et al.*, 1999; KINKERDALE, 2009), foraminíferos (FAY; WEBER; LIPPS, 2009; POCHON *et al.*, 2001) e esponjas (ANNENKOVA; LAVROV; BELIKOVA, 2011; HILL *et al.*, 2011)

O sucesso da simbiose entre cnidários e dinoflagelados é demonstrado pela dominância de recifes de coral em águas rasas tropicais, com uma estimativa de cerca de 700 espécies de corais que apresentam simbiose com dinoflagelados (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008), com cada uma dessas espécies podendo hospedar milhares de zooxantelas por centímetro quadrado de tecido (WEIS, 2008).

Os benefícios mais importantes compartilhados por essa associação são nutricionais, pois os dinoflagelados mantêm sua capacidade fotossintética quando em simbiose e transferem para o hospedeiro muito do carbono orgânico produzido, contribuindo substancialmente no suprimento de carbono e energia para o hospedeiro (MUSCATINE, 1990). As zooxantelas provêm aos animais hospedeiros 95% do requerimento diário de energia necessário à sobrevivência do coral (EDMUNDS; DAVIES, 1986; FALKOWSKI *et al.*, 1984; MUSCATINE; PORTER, 1977). Reciprocamente, o hospedeiro contribui com o metabolismo do endossimbionte, transferindo nutrientes essenciais (tais como nitrogênio, fósforo e compostos sulfurosos) produzidos pelo catabolismo de macromoléculas derivadas de partículas de alimento ou absorvidos do meio (COOK; D'ELIA, 1987).

1.1 Diversidade e Distribuição das Zooxantelas

Ao longo da evolução, a relação de benefício mútuo entre dinoflagelados e corais gerou uma grande diversidade de simbiontes e de modos como esses simbiontes interagem com o hospedeiro. É atualmente impossível estimar quantas espécies de dinoflagelados simbiontes existem, mas o principal gênero de dinoflagelado simbionte encontrado em corais e em outros invertebrados marinhos é o gênero *Symbiodinium*.

A princípio, as zooxantelas eram classificadas como *Symbiodinium microadriatum*, uma espécie pandêmica. Atualmente, estudos de biologia molecular têm indicado que o gênero *Symbiodinium* é altamente diverso. A identificação molecular das zooxantelas revela que existem diferentes subgêneros ou subgrupos, conhecidos como clados. Atualmente reconhece-se 6 clados diferentes de *Symbiodinium*: A, B, C, D, E e F (BAKER, 2003; ROWAN; POWERS, 1991b; VISRAM; DOUGLAS, 2006) que podem, assim como as bactérias simbiotes, ser espécie-específicos.

A distribuição de *Symbiodinium* em corais varia em diferentes partes do mundo, com alguns amplamente distribuídos entre diferentes hospedeiros e em diferentes regiões geográficas enquanto outros mostram ter especificidade para um determinado hospedeiro ou endemismo para certas regiões geográficas (BAKER, 2003). Além disso, mudanças sazonais podem criar variações ambientais que favorecem diferentes simbiotes (COSTA; SASSI; AMARAL, 2004).

1.2 Funções Biológicas e Adaptações Fisiológicas entre Cnidários e Zooxantelas

A associação simbiótica entre dinoflagelados unicelulares e invertebrados existe, pelo menos, desde o Triássico (225 milhões de anos) (ROSEN, 2000) e atualmente especula-se como esses animais adquiriram seus simbiotes ao longo da evolução dessa relação simbiótica.

Como comentado no capítulo 1, os cnidários podem adquirir seus simbiotes através da transmissão fechada ou vertical, quando os simbiotes podem ser passados maternalmente de uma geração para a próxima através dos ovos ou de maneira aberta ou horizontal onde cada geração pode adquirir simbiotes do ambiente circundante (GÓMEZ-CABRERA *et al.*, 2008). Nesse último caso, a larva plânula, carente de zooxantelas, depende de reservas armazenadas para sua nutrição (GAITHER; ROWAN, 2010).

Embora os cnidários com sistema aberto (ou horizontal) de transmissão de simbiotes possam ser suscetíveis à colonização por todos os simbiotes disponíveis no ambiente circundante, há um grande grau de especificidade entre simbiote e hospedeiro (BAKER, 2003; LAJEUNESSE, 2002). Ambos os modos de aquisição de simbiotes (horizontal ou vertical) tem suas vantagens e desvantagens: a transmissão vertical assegura que a larva do coral já esteja equipada com seus simbiotes, enquanto na horizontal as larvas têm de adquirir esses simbiotes do ambiente. Todavia, a transferência horizontal tem a vantagem de

permitir que as larvas capturem zooxantelas que podem ser adaptadas às especificidades do ambiente (TRENCH, 1987).

Ainda segundo Trench (1987), na transmissão horizontal ou aberta, as zooxantelas podem ser capturadas: 1) pelo ovo ou embrião em desenvolvimento; 2) pela ectoderme do coral adulto, migrando posteriormente para a endoderme, e 3) as zooxantelas podem ser capturadas diretamente pela endoderme. Neste último modo, os simbiosites entram pela boca do hospedeiro e são captados pelas células que revestem a cavidade gastrovascular ou endoderme do pólip. Esse último modo de captura foi encontrado no coral *Fungia scutaria*, um coral que habita as águas do Indo-Pacífico. Schwarz; Weis; Potts (2002) concluíram que as larvas de *F. scutaria* captura ativamente zooxantelas em aquário através da boca e que a aquisição de zooxantelas auxilia no processo de assentamento larval e desenvolvimento do pólip. Segundo esses autores, o fato das larvas de *F. scutaria* serem capazes de se beneficiar com as zooxantelas antes do assentamento pode ter permitido a disseminação através das águas do Indo-Pacífico.

Mas, conhecendo-se agora as diferentes formas de captura das zooxantelas pelos corais, ainda surge uma questão: qual é o próximo passo após a captura dessas zooxantelas? Como estas larvas reconhecem e introduzem as zooxantelas em suas células e como esses corais retêm os simbiosites em seus tecidos?

Na transmissão aberta, os simbiosites são indiscriminadamente ingeridos de uma maneira similar a qualquer outra partícula de alimento. Todavia, os vacúolos digestivos reconhecem o simbiote correto e evitam a fusão dos lisossomos e posterior digestão pelo hospedeiro (CHEN *et al.*, 2003).

Após o reconhecimento as zooxantelas migram então para o meio intracelular do hospedeiro. Fitt e Trench (1983) verificaram que um mecanismo comum chamado endocitose é responsável pela introdução dos simbiosites nas células do hospedeiro. Esses pesquisadores observaram que, após a absorção, as zooxantelas residiam no interior de um vacúolo, pequenos compartimentos destinados exclusivamente para os simbiosites. Lá, as zooxantelas produziam açúcares por meio da fotossíntese e, provavelmente, começam a beneficiar as larvas antes mesmo do assentamento.

Segundo Yellowlees; Rees; Leggat (2008), após entrar em contato com o coral, o simbiote é envolto por uma membrana produzida pelo hospedeiro, conhecida como simbiossomo. Após a entrada na célula hospedeira a membrana plasmática e a parede celular

da célula simbiótica são envoltas por um complexo de camadas derivadas do hospedeiro, que por sua vez é envolto pela membrana plasmática do hospedeiro. Esta arquitetura multi-membrana exige que os metabolitos que passem entre o simbiote e o hospedeiro devam atravessar essas membranas celulares múltiplas. Todos os nutrientes trafegam entre o simbiote e o hospedeiro através das múltiplas camadas do simbiossomo, permitindo a interação entre eles. Assim, os simbiossomas são encontrados dentro de um vacúolo produzido pelo animal hospedeiro e esse arranjo celular permite ao cnidário hospedeiro algum controle sobre o metabolismo de transferência entre ele e seu simbiote.

Após a entrada do simbiote, formação do simbiossomo e estabelecimento do dinoflagelado nos tecidos do hospedeiro, há uma clara interação metabólica entre eles. As zooxantelas requerem nutrientes que são derivados do hospedeiro ou do ambiente em volta, e o hospedeiro em troca adquire produtos da fotossíntese do simbiote autotrófico (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

A simbiose entre invertebrados e dinoflagelados constitui uma fonte de pressões seletivas que tem modificado profundamente a fisiologia do hospedeiro ao longo da evolução. As relações simbióticas não são simples soma de organismos e suas atividades metabólicas são intimamente integradas e dinâmicas (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). O estilo de vida simbiótico envolve adaptações ecológicas, fisiológicas, estruturais e moleculares em simbiossomas e hospedeiros, modificando ou adquirindo novas capacidades metabólicas, algumas delas discutidas a seguir.

Para que o processo fotossintético funcione de forma adequada, o simbiote tem alguns requerimentos nutricionais, dentre eles a necessidade de nitrogênio. Contudo, muitos hospedeiros vivem em ambientes pobres em nitrogênio. Assim, a aquisição e retenção de nutrientes é um problema para os organismos que vivem nesses ambientes. Porém, os cnidários têm desenvolvido estratégias para assimilar e conservar nitrogênio, mesmo em ambientes pobres nesse composto.

Animais marinhos em geral não são capazes de assimilar nitrogênio inorgânico do ambiente externo e geralmente excretam amônia ou uréia na água circundante. Em contraste, em simbiose com corais, as zooxantelas são capazes de absorver, reter e incorporar nitrogênio inorgânico da água do mar em concentrações consideráveis (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). Segundo Muscatine *et al.* (1989), o nitrogênio inorgânico pode ser assimilado de duas várias formas principais: primeiro, o amônio resultante do metabolismo do animal e digestão

das presas pelo hospedeiro não é excretado na água do mar circundante, ao contrário, é imediatamente re-assimilado pelas zooxantelas e reciclado minimizando as perdas de nitrogênio via excreção e segundo, cnidários em simbiose com zooxantelas são aptos a absorver diversas formas de nitrogênio inorgânico do meio tais como amônio e nitrato por um processo luz-dependente. A luz captada pelas zooxantelas estimula a captação de amônio com o envolvimento da enzima glutamato sintase, encontrada em muitos outros sistemas fotossintéticos. As zooxantelas correspondem, provavelmente, ao principal sítio de assimilação de nitrogênio inorgânico do meio, transformando-o em compostos orgânicos e transferindo, pelo menos, uma parte desses compostos para o hospedeiro. O animal hospedeiro pode assim ter conquistado uma capacidade metabólica complexa geralmente ausente no reino animal (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005). A habilidade de assimilar amônio da água do mar é a principal razão para sucesso da simbiose em oceanos tropicais pobres em nutrientes (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

Outro requerimento para a fotossíntese dos simbiontes é o carbono. Yellowlees; Rees; Leggat *et al.* (2008) discutiram que a quantidade de CO₂ na água do mar é demasiadamente baixa para permitir a fixação ótima de carbono durante a fotossíntese das zooxantelas. Consequentemente, inúmeros organismos marinhos fotossintetizantes têm que desenvolver mecanismos para concentrar carbono. A fotossíntese líquida medida em cnidários que apresentam simbiontes fotossintéticos indica a presença de uma fonte externa de carbono inorgânico, o que implica no transporte de carbono inorgânico exógeno através do simbiossomo (ALLEMAND; FURLA; BÉNAZET-TAMBUTTE, 1998). Assim, apesar das atividades metabólicas de todas as células animais envolverem eliminação do carbono inorgânico, o anfitrião coral deve constantemente absorver o carbono inorgânico de volta para fornecer os seus simbiontes com CO₂ suficiente para a fixação pela Rubisco a fim de manter o elevado nível de produtividade primária líquida. A absorção do carbono inorgânico dissolvido (CID) da água do mar, portanto, implica em um transporte desde o meio externo através das múltiplas camadas do simbiossomo, até chegada aos dinoflagelados simbióticos. CO₂ e HCO₃⁻ da água do mar são fontes potenciais de CID. Enquanto o primeiro é livremente difusível na bicamada lipídica das membranas celulares, o segundo é um íon carregado, incapaz de difundir através desta barreira e necessitando de uma proteína transportadora (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005).

O modelo atualmente aceito para aquisição de CID a partir de HCO_3^- foi descrito por Yelowlees; Rees; Leggat (2008) e Furla; Allemand; Shick (2005) e envolve a formação de vesículas de membrana e o processo depende da secreção de uma enzima chamada H^+ -ATPase. Essa enzima acidifica a camada externa da célula onde bicarbonato é convertido em CO_2 por uma anidrase carbônica. Esse CO_2 é subsequentemente difundido para dentro da célula do hospedeiro seguindo o gradiente de concentração onde é convertido e então transportado para dentro do simbiossomo por uma via desconhecida e então utilizado na fotossíntese. Portanto, as células do hospedeiro desempenham um papel ativo principal na captação da CID para o funcionamento da fotossíntese do simbiote em níveis ideais.

Com a fotossíntese funcionando adequadamente, o animal hospedeiro passa a se beneficiar através da incorporação de carbono proveniente do processo fotossintético de seu simbiote. Em condições normais, as zooxantelas podem produzir cerca de 100 vezes mais carbono no que eles necessitam para seu próprio crescimento e reprodução e muito desse excesso é transferido para o coral hospedeiro (MUNN, 2004).

A fixação de carbono pelos recifes de coral é seis vezes maior do que em ambientes oligotróficos vizinhos, permitindo a formação de um complexo ecossistema o qual provê nichos pra diversos tipos de organismos (REEF; KANIEWSKA; HOEGH-GULDBERG, 2009).

Atualmente é reconhecido o papel benéfico das zooxantelas também na regulação osmótica do hospedeiro. Mayfield; Gates; Ruth (2007) demonstraram que zooxantelas simbióticas vivem dentro de um ambiente osmoticamente diferente daquele onde vivem como dinoflagelados de vida livre. Segundo esses autores, as zooxantelas podem ajudar na osmorregulação do hospedeiro durante sua própria osmorregulação por meio do fluxo de compostos através do simbiossomo levando ao equilíbrio de sais entre os compartimentos externo e interno.

Além da vantagem nutricional e da regulação osmótica, a simbiose de cnidários com zooxantelas também beneficia os corais através da formação do esqueleto de carbonato e cálcio, característico de corais escleractínios. De acordo com Reef; Kaniewska; Hoegh-Guldberg (2009), 15% da energia de um coral é utilizada para a produção de seu esqueleto de carbonato de cálcio. Esse esqueleto tem múltiplos papéis no recife, tal como proteção e força estrutural. O esqueleto é extracelular e encontra-se na base do tecido da colônia. É formado de CaCO_3 cristalizado em aragonita, matéria orgânica e metais traço (REEF; KANIEWSKA; HOEGH-GULDBERG, 2009). Em 1959 Goreau descreveu o mecanismo de calcificação dos corais

e reconheceu o papel das zooxantelas durante o processo. Posteriormente, foi estabelecido e aceito que o papel das zooxantelas na calcificação é transferir para o coral hospedeiro a maior parte do excesso de carbono que será utilizado nesse processo (SMALL; ADEY, 2001).

As zooxantelas não só auxiliam na construção das estruturas de CaCO_3 que sustentam o coral, mas também aproveitam os benefícios dessa estrutura calcária. Os simbiossitos podem utilizar a luz do sol seis vezes mais eficientemente do que plantas e o esqueleto branco altamente reflexivo pode dispersar a luz para tecidos adjacentes, aumentando a chance dos fótons fotossinteticamente ativos interagirem com as zooxantelas simbiossitos (ENRÍQUEZ; MENDEZ; IGLESIAS-PRIETO, 2005). Essa dispersão da radiação fotossinteticamente ativa permite que o coral aumente o rendimento fotossintético do simbiossito.

Por outro lado, a necessidade da luz para a fotossíntese da zooxantela traz alguns problemas, os quais são resolvidos de maneira eficaz pelos hospedeiros e simbiossitos. Um deles é o problema gerado pela alta incidência da luz solar nas colônias.

O aumento da radiação UV-B que atinge a superfície devido ao esgotamento do ozônio estratosférico da terra levantou a questão sobre o efeito dessa radiação nos ecossistemas marinhos. Os tecidos dos corais são geralmente expostos a intensa radiação solar em águas claras tropicais, onde altos níveis de radiação ultravioleta representam um problema potencial causando danos aos tecidos (REEF; KANIEWSKA; HOEGH-GULDBERG, 2009).

Em águas oceânicas mais claras a radiação UV-B pode penetrar várias dezenas de metros e, mesmo em águas costeiras, que têm uma forte atenuação da radiação UV, essa radiação pode causar efeitos prejudiciais para os organismos aquáticos (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005). Um dano direto da absorção de UV pelo DNA dos tecidos do coral é a formação de Dímeros de Pirimidina Ciclobutano (CPDs), os quais podem levar a danos na estrutura do DNA, podendo induzir a parada da fotossíntese, inibição do crescimento e finalmente morte celular (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005; REEF; KANIEWSKA; HOEGH-GULDBERG, 2009).

Esse fato forçou os corais a se adaptarem para interceptar e aproveitar a radiação fotossinteticamente ativa (RFA). Reef; Kaniewska; Hoegh-Guldberg (2009) mostraram que a propriedade do esqueleto de carbonato de cálcio de refletir radiação ultravioleta, enquanto dissipa RFA para o tecido subjacente é uma adaptação que evita danos aos seus tecidos, ou seja, o esqueleto pode servir como uma defesa contra UV protegendo o tecido vivo, reduzindo os níveis de UV que podem ser prejudiciais. O esqueleto emite radiação ultravioleta como uma fluorescência amarela, dissipando a radiação nociva. Assim, enquanto a exposição

à radiação solar é importante para o crescimento do coral, evitar danos ao tecido é de vital importância para a sobrevivência desses animais. Em um experimento no ambiente natural, Reef; Kaniewska; Hoegh-Guldberg (2009) perceberam que a absorção de UV pelo esqueleto e sua capacidade de refletir essa radiação pode resultar na redução da quantidade de UV à qual tecido do coral é exposto. Esses autores transplantaram um grupo de anêmonas-do-mar para o topo de um esqueleto de recife de coral e outro grupo para um refletor artificial no mesmo ambiente e verificaram que os danos causados pela UV foram sete vezes maiores em anêmonas no topo do refletor artificial do que naquelas que estavam no topo de um esqueleto de coral quando expostas à mesma intensidade de luz UV.

Outra estratégia de tolerância à UV é a produção de compostos conhecidos como microsporinas (MAAs)(AL-UTAIBI; NIAZ; AL-LIHAIBI, 2009). A maioria das espécies eucarióticas de fitoplâncton marinho que são conhecidos por acumular MAAs são dinoflagelados e diatomáceas. Zooxantelas associadas a corais estão entre os primeiros organismos reportados por conter microsporinas (MMAs) que absorvem radiação UV e dissipam a energia dessa radiação como calor, sem formar radicais livres ou compostos tóxicos aos corais. Entretanto, ainda resta a dúvida: se as zooxantelas são estimuladas a produzir MMAs quando em simbiose com corais ou se os corais modificam os MMAs que são fornecidos naturalmente pelas algas. Acredita-se que as bactérias associadas também tenham um papel na biossíntese de MMAs, embora essa informação ainda não tenha sido confirmada (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005).

Outro problema inerente da fotossíntese pelos simbiossitos é em relação ao acúmulo de O_2 produzido durante a fotossíntese no tecido do hospedeiro. Furla, Allemand; Shick (2005) comentaram que a fotossíntese dos simbiossitos leva não somente à fixação de CO_2 , mas também à liberação de O_2 . Antes do O_2 ser liberado na água do mar, ele causa hiperoxia local, o que pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio, dentre eles os radicais livres, causando danos aos hospedeiros. Dentre as consequências disso estão: estresse oxidativo envolvendo oxidação da membrana lipídica, danos ao DNA e às proteínas e posteriormente envelhecimento celular e morte. Cnidários que abrigam simbiossitos fotossintéticos desenvolveram um mecanismo para evitar os danos causados pela hiperoxia. Esses animais produzem substâncias anti-oxidativas envolvendo enzimas chamadas Superóxido Dismutases (SOD), além de Catalases e Peroxidasas que diminuem os efeitos nocivos da hiperoxia.

Outro mecanismo que os corais hospedeiros tiveram que desenvolver foi a capacidade de controlar a população de zooxantelas em seus tecidos. As células hospedeiras têm uma flexível, mas finita, capacidade de acomodar zooxantelas, regulando seu número (DIMOND; CARRINGTON, 2008). Hoogenboom, Beraud, Ferrier-Pàges (2009) comentaram que há uma densidade de zooxantelas ótima para a fotossíntese, o que força os corais a manter o número de zooxantelas regulado.

Os mecanismos para a regulação da densidade de zooxantelas incluem: retroalimentação negativa densidade-dependente via limitação de espaço ou nutrientes (JONES; YELLOWLEES, 1997; YELLOWLEES; REES; LEGGAT., 2008); manipulação do ciclo celular do simbionte pelo hospedeiro (SMITH; MUSCATINE, 1986); remoção das zooxantelas através da degradação ou digestão de simbiontes (TITLYANOV *et al.*, 1998) e expulsão de simbiontes intactos dos tecidos do hospedeiro (HOEGH-GULDBERG; SMITH, 1989). Esse último mecanismo tem sido descrito para anêmonas e corais como mecanismo regulador da densidade de zooxantelas e acredita-se que seja responsivo às mudanças climáticas (DIMOND; CARRINGTON, 2008).

As zooxantelas podem beneficiar os corais também através do aumento da resistência à fatores adversos. Atualmente é conhecido que os diferentes clados de *Symbiodinium* apresentam diferenças em sua resistência ao aumento da temperatura da água e radiação solar.

Baker (2003) cita que *Symbiodinium* do clado A e/ou B predominam em corais de águas rasas (com alta radiação solar). Corais em níveis intermediários de profundidade podem hospedar 2 ou 3 clados diferentes em seus tecidos. Em relação à distribuição geográfica, *Symbiodinium* do clado C é típico de baixas latitudes, como na região tropical, sendo predominante em muitas espécies de coral. Já o clado A é típico de corais de altas latitudes (LAJEUNESSE, 2001).

O clado D também é considerado como estresse-tolerante (HENNIGE *et al.*, 2011; PETTAY *et al.*, 2011), ocorrendo geralmente em associação com hospedeiros que habitam águas turvas com temperatura variável (OPPEN *et al.*, 2001) e águas quentes (FABRICIUS *et al.*, 2004) ou em corais que passaram por eventos e branqueamento (OPPEN *et al.*, 2005).

Ao contrário da associação obrigatória entre muitos corais tropicais e zooxantelas, muitos corais de regiões temperadas apresentam simbiose facultativa. Dimond e Carrington (2008) discutiram que algumas espécies de corais permitem um aumento na densidade de

simbiontes quando a fotossíntese é vantajosa durante a estação quente, seguida por uma redução da população do simbiote durante a estação fria. Esses autores sugerem que as zooxantelas são heterotróficas em estações de baixa temperatura, assimilando nutrientes provindos do hospedeiro. A verificação da expulsão das zooxantelas revela que esses corais provavelmente persistem em um estágio azooxantelado estável provisório, sugerindo que, nessas espécies, a simbiose é facultativa.

A composição das zooxantelas pode ser modificada por fatores exógenos, como temperatura e luminosidade. Baker (2003) testou a estabilidade no padrão de zonação de zooxantelas em corais do Caribe através do transplante de colônias de águas rasas para águas mais profundas e vice-versa. Esse autor verificou que as colônias transplantadas para águas rasas sujeitas a um maior estresse térmico, mudaram a composição e a densidade das zooxantelas, devido ao processo de branqueamento. Esse autor verificou que corais branqueados foram posteriormente colonizados por novos simbiontes que são mais adaptados a condições ambientais adversas.

Rabelo e Matthews-Cascon (2007) verificaram que a espécie de zoantídeo *Isaurus tuberculatus*, quando submetida à ausência de luz, perdia suas zooxantelas em poucos dias, e as mesmas colônias quando submetidas a luz novamente também tinham a capacidade de recuperá-las, evidenciando a capacidade de recuperação depois do estresse.

Aparentemente, ao longo dos milhões de anos de evolução dessa relação simbiótica, ambos, hospedeiro e simbiote tiveram que modificar o modo como eles interagem, adaptando suas funções metabólicas visando benefício mútuo.

A principal motivação para pesquisar a diversidade, biogeografia e ecologia de *Symbiodinium* em recifes de coral é a natureza obrigatória desse tipo de relação para muitos hospedeiros. O conhecimento de como a diversidade de simbiontes é afetada e sua susceptibilidade à eventos de branqueamento podem ser aplicados para prever ou entender a severidade dos processos de aquecimento a nível global (BAKER, 2003).

A diversidade, ecologia e biogeografia de dinoflagelados, são comparativamente fáceis de investigar comparado a outros eucariontes unicelulares, devido ao fato desses simbiontes habitarem primariamente tecidos de hospedeiros sedentários permitindo a amostragem fácil para estudos moleculares (SHEARER; GUTIERREZ-RODRIGUEZ; COFFROTH (2004) e, com o advento de métodos moleculares de identificação, o conhecimento sobre a ecologia e biogeografia de simbiontes está avançado rapidamente.

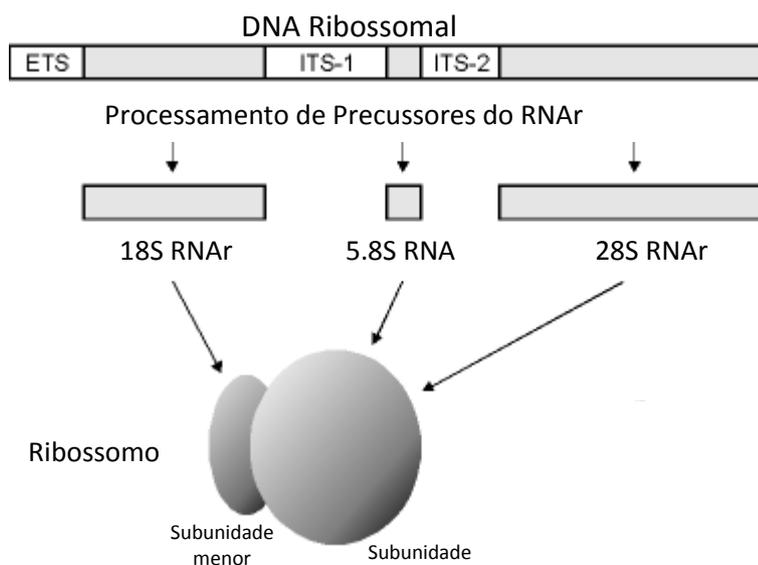
1.3 Métodos moleculares aplicados ao estudo da simbiose entre Corais e zooxantelas

A grande dificuldade em identificação dos diferentes clados de *Symbiodinium* por técnicas morfológicas têm levado muitos pesquisadores a utilizar técnicas moleculares de identificação auxiliando na análise filogenética desses clados.

Segundo Shearer; Gutierrez-Rodriguez; Coffroth (2004) o uso de marcadores específicos contribui de maneira significativa em análises onde padrões biogeográficos e filogenéticos de zooxantelas não refletem necessariamente as do hospedeiro. Através de estudos moleculares, têm se mostrado que a simbiose é mais flexível do que se achava, com diferentes hospedeiros e simbioses mostrando vários graus de especificidade em suas associações (BAKER, 2003).

Atualmente, vários genes são utilizados como marcadores moleculares nos estudos da filogenia e taxonomia de simbioses. Os mais amplamente utilizados e úteis para a identificação e definição das relações filogenéticas entre os clados de *Symbiodinium* são os genes na fita de DNA que codificam para o RNA ribossômico (RNAr). A figura 18 mostra como está arranjada a seqüência de genes que codificam para a formação do ribossomo de *Symbiodinium*.

Figura 18: Arranjo do gene codificador para o RNA Ribossial de *Symbiodinium*. Modificado de Wolfgang Seifarth (2002)



Na seqüência de genes de DNA que codificam para o RNAr, os genes 28S e 5,8S codificam para o RNAr da subunidade maior do ribossomo (LSU - *Large subunit*) e o Gene 18S codifica para o RNAr da subunidade menor (SSU - *Small subunit*). Os genes 18S e 28S dos

eucariontes estão separados entre si por regiões conhecidas como espaçadores transcritos internos, ou sequências ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Os genes ITS não participam na formação estrutural do ribossomo, acredita-se, entretanto, que essas sequências têm um papel na maturação do mesmo (LALEV; NAZAR, 1998). Os genes ribossomais (28S e 18S) foram os mais conservados durante a evolução do genoma dos eucariontes, pois devem codificar para um ribossomo intacto o qual atuará na síntese protéica. Devido a isso, esses genes apresentam uma grande similaridade entre os eucariotos. Já nas regiões espaçadoras de DNA (ITS) a homologia é menor porque essas regiões não contribuem para o RNA estrutural, ou seja, mesmo em espécies muito próximas, pode haver grandes diferenças genéticas nesses genes.

Os genes que codificam o RNA ribossômico da subunidade menor (18S) são extensamente utilizados em pesquisas moleculares porque apresentam algumas vantagens: 1) são distribuídos universalmente em todos os eucariontes; 2) são funcionalmente constantes; 3) são suficientemente conservados, modificando-se lentamente e 4) apresentam tamanho adequado. O gene 28S é também altamente informativo em termos filogenéticos, sua sequência mais longa fornece informações adicionais, porém, seu comprimento torna o sequenciamento desse gene dispendioso e demorado (MADIGAN *et al.*, 2010). Atualmente muitos pesquisadores têm utilizado as sequências espaçadoras (ITS) na identificação molecular de dinoflagelados simbiotes. Através do sequenciamento desses genes é possível perceber sutis diferenças entre os clados de *Symbiodinium*, contribuindo para o entendimento da diversidade e distribuição desses simbiotes (BAKER, 2003; LAJEUNESSE, 2001, 2002; LAJEUNESSE *et al.*, 2003).

As mesmas técnicas utilizadas para a identificação molecular de bactérias simbiotes de corais podem ser aplicadas para a identificação de zooxantelas, dentre elas: clonagem e sequenciamento, RFLP e DGGE, comentadas no capítulo 2.

Um trabalho pioneiro desenvolvido por Rowan e Powers (1991 a, b), realizado há mais de 20 anos, já fez uso de ferramentas moleculares. Através dessa pesquisa, os autores classificaram 22 tipos de zooxantelas usando reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar pequenas subunidades de RNA de zooxantelas isoladas de corais. Os resultados da pesquisa desses autores foram importantes para elucidar as relações filogenéticas entre linhagens de zooxantelas associadas a corais. Desde então, muitos trabalhos têm utilizado ferramentas moleculares para o estudo das relações entre zooxantelas e seus hospedeiros.

A biologia molecular também foi uma ferramenta importante para o estudo das zooxantelas em anêmonas (KUO *et al.*, 2004); foraminíferos (FAY *et al.*, 2009), esponjas (HILL *et al.*, 2005; HILL *et al.*, 2011) e moluscos (BURGHARDT, 2008; KIRKENDALE, 2009). Embora as técnicas tenham avançado nos últimos anos, Apprill e Gates (2007) discutiram que somente uma técnica não responde satisfatoriamente questões relativas à diversidade, biogeografia e biologia de corais e simbiontes. Esses autores citam a importância da união de várias técnicas para melhor responder a essas questões.

Os estudos moleculares ainda irão avançar muito, e o desenvolvimento de técnicas de genética aplicada tem se mostrado promissores no estudo de corais e novas tecnologias deverão surgir para preencher a grande lacuna que ainda há sobre o conhecimento da simbiose entre micro-organismos e animais marinhos.

As técnicas moleculares podem ainda ajudar a elucidar algumas questões relativas ao comportamento competitivo e resistência dos corais frente a fatores adversos através do estudo da microbiota associada.

Rabelo (2007) verificou que as espécies de zoantídeos estão sujeitas a fatores ambientais adversos como alta exposição solar e dessecação durante a maré baixa. Observações pretéritas sugerem que *Z. sociatus* é a espécie mais resistente a estes fatores adversos, uma vez que esse zoantídeo é o único a sobreviver fixo a rochas elevadas sujeitas a exposição solar por mais tempo durante a maré baixa, enquanto as outras duas espécies têm preferência por locais mais úmidos e abrigados.

Sabendo-se que muitos clados de *Symbiodinium* podem estar envolvidos na capacidade de resistência dos hospedeiros, o conhecimento sobre a diversidade desses simbiontes nos zoantídeos pode ajudar a explicar o comportamento observado. Diante do exposto, este trabalho levantou as seguintes hipóteses: 1) os zoantídeos apresentam uma alta diversidade de clados de *Symbiodinium*; 2) as espécies de zoantídeos diferem em relação à composição dos clados de *Symbiodinium*; 3) os zoantídeos apresentam clados reconhecidamente resistentes ao aquecimento da água e dessecação; 4) a comunidade de simbiontes é semelhante à presente na água do mar; 5) os clados de *Symbiodinium* presentes no zoantídeos são semelhantes aos clados descritos em outros corais da região tropical.

Sabendo-se da grande importância das zooxantelas na sobrevivência dos recifes de corais e conseqüentemente da fauna marinha e levando-se em consideração a ameaça iminente a que esses ambientes estão sujeitos, compreender a composição, diversidade e as

complexas interações entre as zooxantelas e seus hospedeiros irão fornecer importantes informações sobre a biologia dessas interações, gerando conhecimentos para a conservação dessas espécies. Além disso, a identificação das zooxantelas e a relação com seu papel na resistência do coral é o primeiro passo para o conhecimento sobre a capacidade de sobrevivência e a resiliência desses animais frente a fenômenos de branqueamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a diversidade das zooxantelas associadas a três espécies de zoantídeos, visando compreender possíveis padrões que possam explicar a distribuição espacial em ambiente natural e susceptibilidade à fatores ambientais adversos desses animais, gerando dados para serem usados no monitoramento e conservação dessas espécies.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os clados de *Symbiodinium* presentes nos zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* e *Protopalythoa variabilis*;
- Verificar a especificidade entre hospedeiro e simbiote;
- Comparar a diversidade de *Symbiodinium* nos zoantídeos e água do mar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo da diversidade de zooxantelas dos zoantídeos foram empregadas as mesmas amostras de DNA total utilizadas para a identificação de bactérias. A metodologia de coleta das amostras e extração do DNA foram descritas no capítulo 1.

Para o estudo da diversidade de zooxantelas presentes dos zoantídeos usou-se a região ITS do DNA. A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) varia de 500 a 600 pares de bases e consiste nos genes ITS1, 5.8S e ITS2, presente em animais, e protistas, fungos e macroalgas. Segundo LaJeunesse (2001) é o marcador molecular que melhor reflete a diversidade de zooxantelas do gênero *Symbiodinium* em corais.

3.1 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A composição da solução de amplificação foi a mesma descrita no capítulo 1. Entretanto, a reação de amplificação do gene foi realizada utilizando os iniciadores específicos para a região ITS do DNA de *Symbiodinium*: ITSintfor2 5'-GAA TTG CAG AAC TCC GTG-3' e ITS2CLAMP 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GGG ATC CAT ATG CTT AAG TTC AGC GGGT-3'. A amplificação foi realizada por "Touchdown" como descrito por LaJeunesse (2002). A metodologia para a corrida do gel de DGGE foi a mesma aplicada ao estudo da diversidade bacteriana (capítulo 1), no entanto, o tempo de corrida foi de 9h com voltagem de 200V como sugerido por LaJeunesse (2002).

3.2 Construção de Bibliotecas da região ITS

Para o estudo da composição e diversidade das zooxantelas associadas aos zoantídeos e a água do mar, usou-se como marcador molecular o gene ITS, universal para o Domínio Eukarya.

3.2.1 Amplificação da Região ITS

A região do fragmento relativo ao ITS do DNA foi amplificada por PCR utilizando iniciadores específicos: ITS for (5'-GGGATCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC- 3') e ITS2rev (5'-

GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT- 3'). A PCR foi realizada de acordo como descrito por Smith; Pinzón; LaJeunesse (2009). A amplificação da reação ocorreu como descrito no capítulo 1. As bandas da eletroforese foram visualizadas, excisadas, purificadas e quantificadas como descrito no capítulo 1.

3.2.2 Ligação, Transformação, Clonagem e Sequenciamento do Gene ITS

Os procedimentos de ligação, transformação, clonagem e sequenciamento foram realizados da mesma forma que descrito no capítulo 1.

3.3 Análise dos Dados

3.3.1 Análise do Gel de DGGE

As imagens dos géis de DGGE foram analisadas pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Bélgica). Este programa foi utilizado na normalização, conversão e comparação entre as bandas. O programa gerou matrizes de ausência (0) e presença (1) que foram utilizadas para verificação de bandas exclusivas e compartilhadas e para o cálculo do coeficiente similaridade de Jaccard, com tolerância ao posicionamento das bandas de 1%.

3.3.2 Análise das Bibliotecas do gene ITS

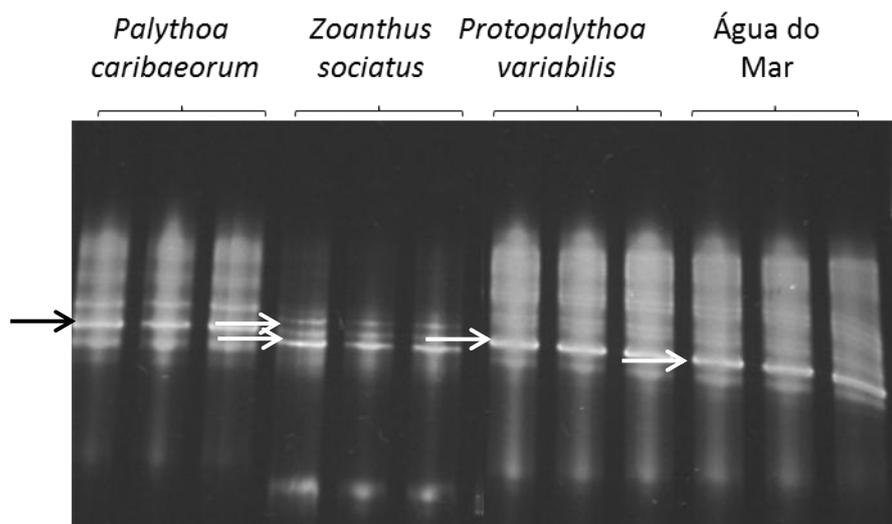
As sequências obtidas foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) usando o programa MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009) o qual foi utilizado para cálculo dos índices de diversidade e construção das curvas de rarefação, considerando uma similaridade de 98%. Os gráficos de abundância para os clados de zooxantelas associadas às amostras de zoantídeos foram gerados pelo programa Excel 2010. Para verificar estatisticamente as diferenças entre as bibliotecas foi utilizado o programa S-Libshuff 1.22 (SINGLETON *et al.*, 2001). As sequências foram classificadas de acordo com o banco de dados do NCBI, onde cada sequência foi confrontada com o banco de dados e as similaridades acima de 80% foram consideradas.

4. RESULTADOS

4.1 Estrutura da comunidade de zooxantelas associadas aos zoantídeos

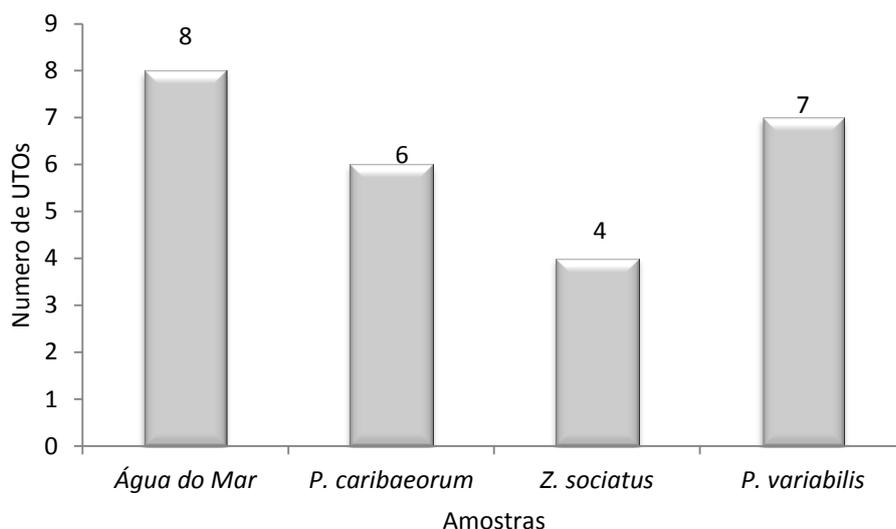
Os resultados da DGGE mostram que há a presença de poucas UTOs nas 3 espécies de zoantídeos amostradas e água do mar e que algumas são exclusivas (Figura 19). Os resultados da DGGE revelaram que há uma certa semelhança entre a comunidade de zooxantelas entre as três espécies de zoantídeos embora o padrão de migração de algumas bandas tenha sido diferente, pressupondo que algumas UTOs foram exclusivas. Além disso, os resultados indicam a presença de zooxantelas de vida livre.

Figura 19: Estrutura das comunidades de zooxantelas associadas aos zoantídeos *Palythoa caribaeroum*, *Zoanthus sociatus*, *Protopalythoa variabilis* e água do mar. Amostras em triplicata. As setas destacam as bandas mais intensas de cada uma das amostras.



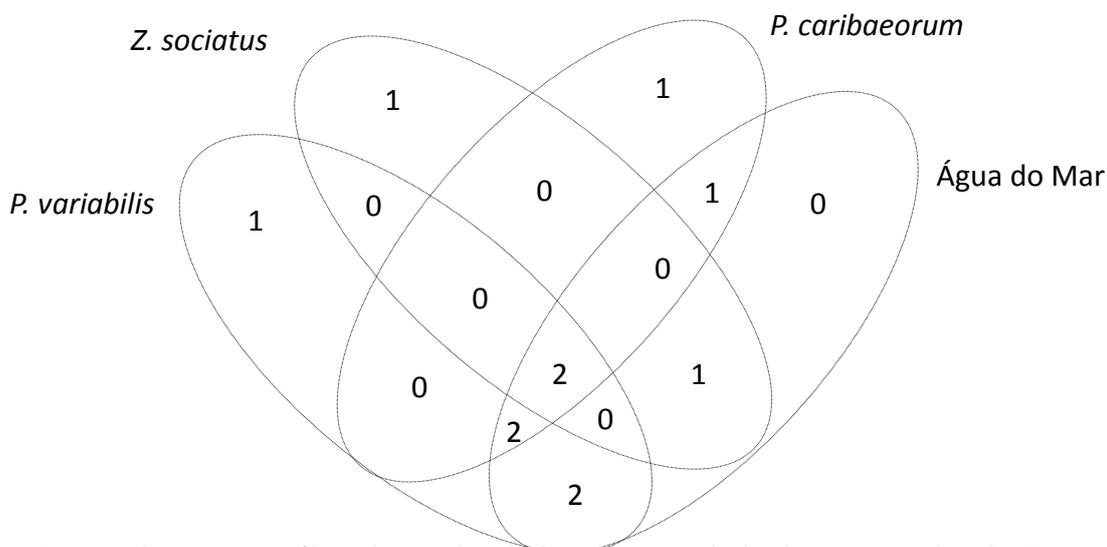
A análise do número de UTOs para cada amostra revelou que a água do mar apresenta maior riqueza de UTOs de zooxantelas e *Z. sociatus* apresenta a menor riqueza de filotipos (Figura 20).

Figura 20: Riqueza de UTOs para as amostras de zoantídeos e água do mar.



O diagrama de Venn, confeccionado a partir dos dados de presença e ausência das bandas no gel revela que apenas duas UTOs foram compartilhadas entre as três espécies de zoantídeos e a água (Figura 21), indicando que a comunidade de zooxantelas dos zoantídeos pouco se assemelha com a comunidade desses simbiontes na amostra de água. Apenas uma UTO foi exclusiva para cada espécie de zoantídeo e nenhuma UTO foi encontrada exclusivamente na água do mar. Por outro lado, 2 UTOs foram compartilhadas entre *P. variabilis* e água do mar, pressupondo uma maior semelhança entre essas amostras.

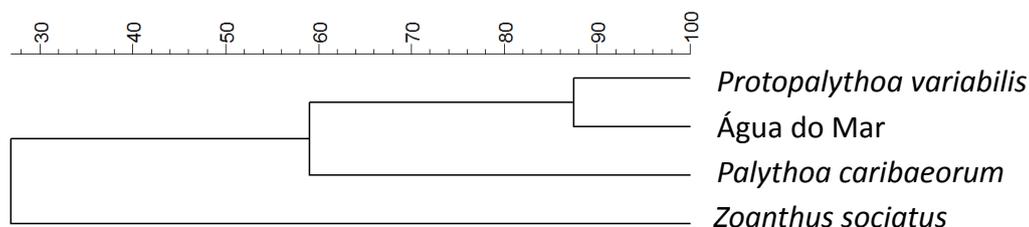
Figura 21: Diagrama de Venn baseado nas UTOs compartilhadas e únicas entre as espécies de zoantídeos e a água do mar.



De acordo com a análise de similaridade, a comunidade de zooxantelas de *P. variabilis* foi semelhante à comunidade de zooxantelas da água do mar. A comunidade de zooxantelas

de *Z. sociatus* foi a que apresentou maiores diferenças em relação às outras amostras (Figura 22).

Figura 22: Similaridade entre as amostras baseada na composição de UTOs de *Symbiodinium* revelada por DGGE.



4.2 Diversidade de *Symbiodinium* através da análise das bibliotecas do gene ITS

Não foi possível a amplificação do gene ITS de *Symbiodinium* presente na amostra de água do mar. Assim, somente as amostras de zoantídeos foram utilizadas para a comparação da diversidade de *Symbiodinium*. Os dados gerados pelo Mothur, que analisa a diversidade das sequências indicam que *Z. sociatus* apresenta a maior riqueza de sequências únicas de *Symbiodinium* (Tabela 8). Assim, dos 92 clones identificados, 31 corresponderam à sequências únicas, enquanto nas outras amostras de zoantídeos, houve um menor número de sequências únicas.

Tabela 8: Numero de clones e riqueza de UTOs de *Symbiodinium* para cada zoantídeo.

Amostras	Número de clones	Número de UTOs
<i>Palythoa caribaeorum</i>	96	16
<i>Zoanthus sociatus</i>	92	31
<i>Protopalythoa variabilis</i>	92	17

Os dados gerados pelo Libshuff, que compara as sequências entre as amostras, demonstraram que as sequencias de *Symbiodinium* presentes em *Z. sociatus* são estatisticamente diferentes das sequencias encontradas em *P. caribaeorum* e *P. variabilis* (Tabela 9). Essa análise indica também que as sequências de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* são semelhantes. Como citado no capítulo 1 essa análise indica se as sequências são diferentes ($P < 0,05$) ou semelhantes ($P > 0,05$) entre as amostras.

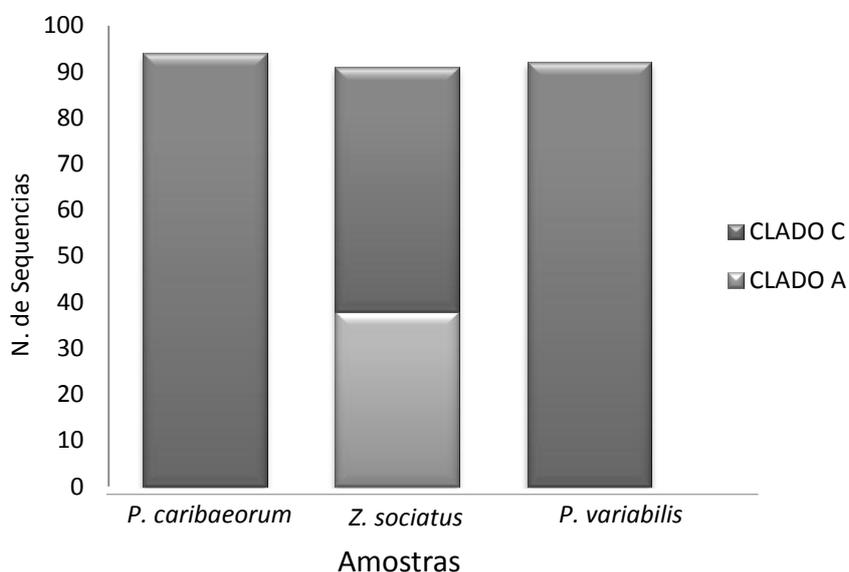
Tabela 9: Comparação estatística (valores de P) entre as amostras em relação à composição das sequências de *Symbiodinium* presentes nos zoantídeos.

Amostras	P
<i>P. caribaeorum</i> x <i>Z. sociatus</i>	<0.0001
<i>P. caribaeorum</i> x <i>P. variabilis</i>	0,6053
<i>P. variabilis</i> x <i>Z. sociatus</i>	<0.0001

Os resultados do sequenciamento do gene ITS mostraram que as três espécies de zoantídeos apresentam baixa diversidade de *Symbiodinium* em seus tecidos. A comparação das sequências com sequências depositadas no banco de dados do NCBI revelou que 100% dos clones oriundos de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* apresentaram alta similaridade com sequências de *Symbiodinium* do subclado C1.

Os clones de *Z. sociatus* também tiveram alta similaridade com sequências depositadas no NCBI sendo classificadas como pertencentes ao clado A e C, com 38 (41,8%) e 53 (58,2%) clones, respectivamente (Figura 23). Apenas duas sequências foram classificadas como pertencentes ao subclado C1.

Figura 2317: Diversidade de zooxantelas para as espécies de zoantídeos.



Índices de diversidade alfa foram calculados para comparar a diversidade de sequências de *Symbiodinium* presentes nas amostras de zoantídeos.

Em relação aos índices de Shannon e Simpson, *Z. sociatus* apresentou a maior diversidade de zooxantelas, sendo diferente estatisticamente de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* (Tabela 10).

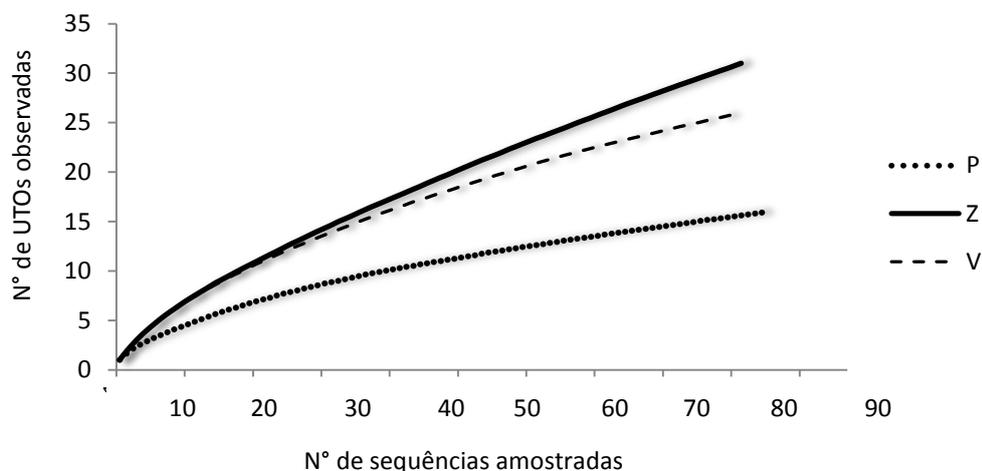
Tabela 10: Índices de diversidade entre as amostras baseado na diversidade das sequências do gene ITS.

	Shannon	Simpson (1-D)
<i>Palythoa caribaeorum</i>	1,64 ^{†*}	0,357 [†]
<i>Zoanthus sociatus</i>	6,44 ^{†ψ}	0,383 ^ψ
<i>Protopythoa variabilis</i>	2,57 ^{ψ*}	0,131 ^{†ψ}

Os símbolos † ψ * representam diferenças significativas entre as amostras ($P \leq 0,05$). Para o índice calculado, a presença do mesmo símbolo em diferentes amostras indica que as mesmas são estatisticamente diferentes.

A riqueza de filotipos foi verificada pelo método de rarefação ao nível de 98% de similaridade (Figura 24). Os resultados mostraram as curvas de *P. caribaeorum*, *Z. sociatus* e *P. variabilis* tenderam à estabilização, convergindo para uma assíntota. Esse resultado sugere que a amostragem realizada foi suficiente para detectar a diversidade de zooxantelas, ou seja, o número de sequências analisadas cobriu a riqueza de filotipos de *Symbiodinium*.

Figura 24: Curvas de rarefação obtidas pelo MOTHUR para o gene ITS de Zooxantelas associadas aos zoantídeos. P: *Palythoa caribaeorum*, Z: *Zoanthus sociatus*, V: *Protopythoa variabilis*.



5. DISCUSSÃO

5.1 Diversidade e papel biológico das zooxantelas associadas aos zoantídeos

Atualmente, trabalhos envolvendo a diversidade de zooxantelas de diversas espécies de corais têm ajudado a entender o complexo sistema conhecido como holobionte. Porém, a grande maioria dos trabalhos envolve o estudo de zooxantelas simbiotes em corais escleractínios, com uma carência de trabalhos envolvendo zoantídeos, particularmente no Brasil. Hoje sabe-se que as zooxantelas desempenham um papel importante na sobrevivência do hospedeiro e que são diretamente envolvidas em sua fisiologia. Além disso, aparentemente muitos corais apresentam especificidade quanto aos seus simbiotes. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a diversidade de zooxantelas do gênero *Symbiodinium* de três espécies de zoantídeos da costa cearense através de técnicas moleculares e inferir sobre seu papel na simbiose, de acordo com dados da literatura. Além disso, este trabalho pretendeu discutir como esses dinoflagelados foram adquiridos pelos hospedeiros e qual a importância deles na sobrevivência dos zoantídeos.

Os dados revelados por DGGE mostram que apenas duas UTOs foram compartilhadas entre as três espécies de zoantídeos e a água, sugerindo que a comunidade de zooxantelas dos zoantídeos difere da comunidade das zooxantelas de vida livre. Uma UTO foi exclusiva para cada espécie de zoantídeo e nenhuma para água do mar, embora 2 UTOs tenham sido compartilhadas entre *P. variabilis* e água do mar, revelando uma maior semelhança entre essas amostras.

Esses resultados apontam para certo grau de especificidade entre simbiote e hospedeiro com cada espécie de zoantídeo apresentando uma comunidade de simbiotes distinta, com poucas UTOs compartilhadas.

Zoanthus sociatus apresentou a menor riqueza de UTOs e interessante, foi a espécie de zoantídeo que mais diferiu das demais amostras em relação à composição das UTOs. Os resultados do sequenciamento corroboraram com a dissemelhança entre *Z. sociatus* e as outras espécies de zoantídeos em relação à composição de seus simbiotes.

Os dados do sequenciamento do gene ITS mostraram que os zoantídeos apresentam baixa diversidade de *Symbiodinium*, com as três espécies de zoantídeos estudadas apresentando o clado C1. O clado A foi encontrado exclusivamente em *Z. sociatus*. Os dados

revelados aqui sugerem que *P. caribaeorum* e *P. variabilis* são extremamente seletivos para o clado C, enquanto *Z. sociatus* apresenta maior flexibilidade na seleção de seus simbiontes.

LaJeunesse (2002) e LaJeunesse *et al.* (2003) comentaram que zoantídeos podem conter uma variedade de clados e subclados de *Symbiodinium* em suas colônias. Entretanto, os resultados apontados aqui sugerem que os zoantídeos apresentam uma baixa diversidade de clados e seus subclados. Esses resultados corroboram com os encontrados por Reimer; Takashita; Maruyama (2006) para *Palythoa tuberculosa* e *Palythoa mutuki*, coletados no Japão. Esses autores verificaram que, embora *Palythoa* seja flexível na sua associação com diferentes clados de *Symbiodinium*, 35 de 36 colônias de *Palythoa* spp. investigados foram associados somente com o clado C1.

Palythoa caribaeorum foi estudado por outros autores, os quais encontraram o clado C em colônias coletadas no Caribe (FINNEY *et al.*, 2010; LAJEUNESSE, 2002) e Malásia (REIMER *et al.*, 2006) e em colônias do mesmo gênero coletadas na Tailândia e Tanzânia (LAJEUNESSE, 2010), Austrália e México (LAJEUNESSE *et al.*, 2004a), Hawái (LAJEUNESSE *et al.*, 2004b; ROWAN; POWERS, 1991a) e Japão (REIMER; TAKASHITA; MARYUAMA, 2006).

Em zoantídeos do gênero *Zoanthus* o clado C foi identificado em colônias coletadas no Japão (REIMER *et al.*, 2007), México (LAJEUNESSE, 2002), Austrália (LAJEUNESSE *et al.*, 2004a) e Hawái (LAJEUNESSE *et al.*, 2004b).

O clado C também está geograficamente distribuído em zoantídeos do gênero *Protopalythoa*, sendo encontrado em simbiose com colônias coletadas no México (LAJEUNESSE *et al.*, 2008) e Hawái (LAJEUNESSE *et al.*, 2004b; ROWAN E POWERS, 1991a).

O clado C também foi encontrado em *Isaurus tuberculatus*, um zoantídeo coletado no Japão (REIMER *et al.*, 2008).

Symbiodinium do clado C tem sido caracterizado com generalista, podendo estar associado com várias espécies de corais e apto a sobreviver em muitas regiões geográficas e sujeito a diferentes condições ambientais (CHEN *et al.*, 2005; COSTA; SASSI; GORLACH-LIRA, 2008; GARREN *et al.*, 2006; POCHON *et al.*, 2010; OPPEN *et al.*, 2001, 2005; YAMASHITA *et al.*, 2010).

O fato de o clado C ter sido encontrado em zoantídeos de diversos ambientes sugere que esse clado é adaptado a diferentes condições ambientais, como discutido por Reimer *et al.* (2006) e sua presença nos zoantídeos estudados na presente pesquisa pressupõe que esses animais desenvolveram uma alta especificidade para esse clado ao longo de sua evolução.

Provavelmente, essa adaptação facilita sua sobrevivência em vários ambientes diferentes. Assim, o clado C pode não ser somente um generalista para seu hospedeiro, mas também um generalista para diferentes ambientes como sugerido por Reimer; Takishita; Mruyama (2006) o que pode ter facilitado a grande dispersão dos zoantídeos pelos oceanos. Esses dados sugerem ainda que, mesmo geograficamente distantes, as espécies de zoantídeos apresentam a mesma composição de simbioses, refletindo em sua especificidade.

Em zoantídeos o clado A também é geograficamente distribuído ao redor do mundo (BAUMS *et al.*, 2010; HENNIGE *et al.*, 2011) embora não tenha sido registrado ainda para o Oceano Atlântico.

O clado A ocorreu em zoantídeos do gênero *Zoanthus* sp. coletados no Japão (REIMER *et al.*, 2007) México (LAJEUNESSE *et al.*, 2008), Jamaica (LAJEUNESSE, 2001), Bahamas (LAJEUNESSE, 2002) e Caribe (ROWAN; POWERS, 1991a). Dados da literatura indicam que, dentre os indivíduos da família Zoanthidae, o clado A somente ocorre no gênero *Zoanthus*, informação confirmada na presente pesquisa.

Baker (2003) cita que vários hospedeiros invertebrados exibem especificidade em relação aos seus dinoflagelados simbioses. Algumas zooxantelas são amplamente distribuídas e encontradas em vários tipos de hospedeiros (generalistas), enquanto outros parecem endêmicos para locais particulares e podem ser restritos a táxons específicos de hospedeiros (especialistas) (BAKER, 1999; LAJEUNESSE, 2002; ROWAN, 1998).

Embora comuns em corais, *Symbiodinium* dos clados A e C foram encontrados também em esponjas (HILL *et al.*, 2011) e foraminíferos (FAY *et al.*, 2009).

No Brasil, não há registros de estudos de zooxantelas associadas à zoantídeos, sendo o primeiro registro da ocorrência dos clados A e C nesses animais no Atlântico Sul. Para o Nordeste do Brasil, apenas trabalhos de Costa; Sassi; Gorch-Lira (2008) e Amaral e Costa (2008) reportam a diversidade de *Symbiodinium* em corais Brasileiros. Costa; Sassi; Gorch-Lira (2008) verificaram a diversidade de zooxantelas no coral escleractínio *Siderastrea stellata* e encontraram somente a presença do clado C nas colônias. Esses autores comentaram que *S. stellata*, um coral conhecido pela sua resistência, pode ter sido favorecido pela presença de zooxantelas clado C em seus tecidos, conferindo maior plasticidade e resistência ao branqueamento.

Embora tenha sido encontrado somente o clado A e o clado C em *Z. sociatus*, LaJeunesse (2002) verificou que colônias dessa espécie de zoantídeo coletadas na península

de Yucatan (México) apresentou os clados A3, A4, B1, C1. A presença do clado B, verificada por LaJeunesse (2002) e ausente nas amostras desta pesquisa, pode ser uma consequência da especificidade ao ambiente, uma vez que alguns clados de *Symbiodinium* são estreitamente relacionados a características ambientais próprias.

Magalon; Flot; Baudry (2007) discutiram que embora alguns corais apresentem forte especificidade pelos seus simbiossitos, alguns corais podem ter diferentes clados de *Symbiodinium* dependendo da região e das características de tolerância de cada clado. Assim, embora altamente espécie-específicos, corais da mesma espécie podem variar seus simbiossitos dependendo de características ambientais. Loh *et al.* (2001) verificaram que o coral *Acropora longicyanthus* coletado na Austrália apresenta zooxantelas do clado C, enquanto colônias da mesma espécie coletadas na Malásia apresentam zooxantelas do clado D.

Corroborando com esses resultados, Cooper *et al.* (2011) examinaram a influência de fatores ambientais na distribuição de *Symbiodinium* associados ao coral *Acropora millepora* coletados em 47 ambientes em uma área de 1.400 km na grande barreira de corais da Austrália e verificaram que os fatores ambientais de cada área de coleta (como diferenças na temperatura da água) podem influenciar na comunidade de simbiossitos. Esses dados podem explicar o fato de *Z. sociatus* não apresentar o clado B, identificado por LaJeunesse (2002) para a mesma espécie.

Segundo Baker (2001), a variação da diversidade das zooxantelas de acordo com características ambientais é vantajosa, pois promove um mecanismo para o coral se adaptar a mudanças nas condições ambientais, uma vez que diferentes clados de zooxantelas diferem em sua termotolerância (KINZIE *et al.*, 2001) o que conseqüentemente, pode contribuir para a termotolerância do holobionte.

Inclusive, a termotolerância dos diferentes clados de zooxantelas é conhecida por muitos autores. Glynn *et al.* (2001) comentaram que diferentes clados de *Symbiodinium* apresentam graus diferentes de resistência ao branqueamento (A>B>C>D). O clado A parece ser adaptado a condições ambientais de estresse, como discutido por Kinzie *et al.* (2001). Esse clado foi encontrado no coral *Pocillopora damicornis* em poças expostas a alta radiação solar e aumento da temperatura da água durante a maré baixa (MAGALON *et al.*, 2007) confirmando a resistência desse clado a fatores adversos.

A identificação do clado A somente em *Z. sociatus* corrobora a hipótese sugerida por Rabelo (2007) de que essa espécie é a mais resistente à dessecação e exposição solar, ocorrendo em locais bastante expostos durante a maré baixa, e onde nenhum outro cnidário ocorre. A presença do clado A pode estar provavelmente associada a essa resistência. Atualmente, sabe-se que zooxantelas do clado A, são as únicas capazes de produzir quantidades consideráveis de mycosporine-like aminoácidos (MAAs) (BANASZAK *et al.* 2000), compostos que auxiliam na proteção contra os danos da radiação UV (NEALE *et al.*, 1998). Assim, a proteção contra raios UV através de síntese MAA pode conferir uma vantagem competitiva ao hospedeiro sob condições de alta irradiância.

Ressalta-se ainda que zooxantelas que apresentam alta tolerância a variações de temperatura, como as pertencentes ao clado A, têm maior capacidade de produzir DMSP em comparação com *Symbiodinium* com baixa tolerância a variações de temperatura (STEINKE *et al.*, 2011). A produção de DMSP é importante no ciclo do enxofre e é normalmente degradado por bactérias dos gêneros *Alteromonas* e *Roseobacter* as quais também foram associadas aos zoantídeos, como discutido no capítulo 1.

Além disso, a presença simultânea dos cladoss A e C pode garantir a adaptabilidade de *Z. sociatus* à situações ambientais adversas. Embora muitas colônias pareçam se associar com um único tipo de zooxantela, há um grande número de espécies de corais que apresentam a habilidade de se associar com diferentes tipos simultaneamente (BAKER, 2003). Essa combinação de zooxantelas pode conferir vantagens ecológicas ao hospedeiro em diferentes situações (BERKELMANS; VAN OPPEN, 2006; FABRICIUS *et al.*, 2004).

Karako-Lampert *et al.* (2004) discutiram que zooxantelas do clado C também mostram tolerância às mudanças de temperatura e apresentam baixa suscetibilidade ao branqueamento, embora sua termotolerância seja menor que a do clado A (Glynn, 1991). De fato, após um evento de branqueamento, Visram e Douglas (2006) verificaram que o clado C estava presente em todas as espécies de corais estudados, demonstrando a resistência desse clado a mudanças ambientais.

Palythoa caribaeorum e *P. variabilis* ocorrem em áreas de menor estresse comparada a área de ocorrência de *Z. sociatus* formando densas colônias em áreas mais planas, protegidas e constantemente úmidas devido à formação de pequenas poças de maré. Aparentemente, essas duas espécies são menos resistentes a dessecação, não ocorrendo na área de abrangência de *Z. sociatus*, mesmo havendo substrato disponível para colonização. A

razão para *P. caribaeorum* e *P. variabilis* não formarem associações com *Symbiodinium* do clado A é desconhecida, mas sugere que a ausência do clado A pode estar associada a menor resistência do hospedeiro a fatores adversos, forçando suas distribuições em áreas menos sujeitas a estresse.

Shahhosseiny *et al.* (2011) também estudaram corais coletados em poças de maré, sujeitas a variações de temperatura e salinidade no Golfo Pérsico e verificaram a presença dos clados C e D conhecidamente resistentes às variações ambientais, indicando que esses clados estão relacionados à resistência dos hospedeiros às condições adversas.

Costa (2006) revelou a grande plasticidade de *S. stellata* frente ao branqueamento. Segundo a autora, *S. stellata* sofre branqueamento facilmente e esse evento se repete várias vezes. A autora discute ainda que a recuperação rápida das colônias pode estar associada a presença do clado C, único clado identificado nos tecidos desse coral.

A semelhança na especificidade de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* pelo clado C pode ser explicada pela estreita relação filogenética entre essas duas espécies. Nos últimos anos houve certa confusão no que se diz respeito aos gêneros *Palythoa* e *Protopalythoa* os quais eram unidos em um só gênero: *Palythoa*. Entretanto, a taxonomia corrente já considera que *Palythoa* e *Protopalythoa* constituem táxons separados (RYLAND; LANCASTER, 2003). Alguns autores corroboram com a hipótese de que espécies estreitamente relacionadas podem ter a mesma especificidade por seus simbiossomas (BAKER, 2003) o que explicaria a semelhança na preferência desses zoantídeos apenas pelo clado C.

A seletividade entre simbiote e hospedeiro pode acontecer desde a fase juvenil do coral, como demonstrado por Santos e Coffroth (2003) que mostraram que pólipos recentemente assentados têm muitos clados diferentes de zooxantelas comparados a colônias adultas que apresentam poucos clados. Gómez-Cabrera *et al.* (2008) também mostraram que as larvas têm diferentes tipos de *Symbiodinium* comparadas aos adultos. Das colônias de adultos analisadas, 5,3% têm os clados A, 86,7% apresentam o clado C e 8,0% das colônias têm uma mistura dos clados A e C. Em contraste, os juvenis, coletados no mesmo ambiente apresentavam o clado A, C e D, sugerindo que há diferenças na seletividade de *Symbiodinium* entre as colônias jovens e adultas, mostrando que algumas espécies têm preferências na aquisição de zooxantelas ainda na fase larval. Segundo Little; van Oppen; Willis (2004) aparentemente há um grau de especificidade maior entre zooxantelas e adultos, enquanto em jovens a relação é mais dinâmica. Um estudo de identificação dos simbiossomas

presentes nas larvas de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* poderia elucidar se esses animais apresentam diferentes clados de *Symbiodinium* nessa fase, os quais provavelmente seriam perdidos na fase adulta.

Little; van Oppen; Willis (2004) verificaram que um juvenil de coral cresce 3 vezes mais rápido quando em simbiose com o clado C do que aqueles com o clado D mostrando que esse clado, além de conferir resistência ao hospedeiro, auxilia em seu crescimento.

Segundo Rowan (1988), o clado A encontrado comumente em corais juvenis e larvas, é um clado tolerante à alta radiação solar e essa característica pode conferir vantagens para os recrutas, pois não sofreriam com a alta incidência luminosa, acompanhada da alta radiação UV a que esses estágios são submetidos. Em corais adultos, o tecido mais espesso e a pigmentação (ausente em larvas e juvenis) protegem o coral contra os efeitos da radiação solar (GÓMEZ-CABRERA *et al.*, 2008).

Uma pesquisa bastante intrigante revela a grande capacidade de reconhecimento e especificidade entre hospedeiro e simbiote. Coffroth *et al.* (2010) mantiveram corais branqueados expostos a zooxantelas atípicas para as espécies de corais estudados e verificaram que os corais foram capazes de adquirir novas zooxantelas a partir da coluna d'água após o branqueamento. No entanto, a aquisição foi transitória, indicando que os simbiontes novos eram instáveis. Apenas os simbiontes típicos da espécie de coral, presentes antes do branqueamento, mantiveram-se estáveis após a recuperação das colônias. Dados como esses revelam a grande importância de estudos sobre a diversidade de zooxantelas simbiotes de corais e zooxantelas de vida livre relacionando-os a efeitos pré e pós-branqueamento e compreendendo a capacidade de resiliência dos recifes de corais frente a um impacto.

Uma conclusão que chegamos é que, mesmo *Z. sociatus* abrigando 2 clados que conferem resistência ao branqueamento, esse fenômeno muitas vezes é inevitável. Em condições normais, essa espécie de zoantídeo aparentemente é mais resistente à exposição solar e aumento de temperatura (RABELO, 2007). Entretanto, anomalias térmicas ocorridas em 2009 (SOARES; RABELO, 2012 *in press*) levaram ao branqueamento completo e morte de muitas colônias dessa espécie, o que indica que mesmo os corais com maior resistência frente ao branqueamento, não resistem a um estresse acima do limite tolerado, levando ao declínio desses animais.

5.2 Mas de onde os zoantídeos adquiriram as zooxantelas?

Não foi possível o sequenciamento do gene de *Symbiodinium* de vida livre da água do mar do mesmo local onde os zoantídeos foram coletados. Entretanto, os resultados da DGGE apontaram que houve a presença de uma comunidade de zooxantelas de vida livre e que essa comunidade se diferencia da presente nos zoantídeos. Baseado nos dados de DGGE verificou-se uma maior semelhança entre a comunidade de *Symbiodinium* no zoantídeo *P. variabilis* e na água do mar reforçando a hipótese de que algumas zooxantelas presentes nesse zoantídeo podem ter sido adquiridas através da água do mar circundante.

Por outro lado, a presença de UTOs exclusivas nos zoantídeos e ausentes na água do mar reforça a hipótese de que algumas zooxantelas podem ser transmitidas verticalmente. Resultados semelhantes foram encontrados por Stat *et al.* (2008) os quais observaram que a diversidade de *Symbiodinium* na água do mar e no sedimento é diferente daquela dos corais estudados e que algumas zooxantelas presentes nos corais estavam ausentes nas amostras ambientais sendo transmitidas verticalmente de geração a geração.

Segundo Ryland (1997), zoantídeos do gênero *Protospalythoa* são os únicos dentre os zoantídeos que apresentam transmissão vertical, com as zooxantelas sendo transmitidas via oocistos. Esse autor verificou também que os óvulos de zoantídeos desse gênero contêm uma grande quantidade de zooxantelas, suprindo a larva com seu estoque de simbioses, auxiliando no estoque de reservas energéticas da larva. Entretanto, contrastando os resultados de Ryland (1997), de acordo com os resultados apresentados, *P. variabilis* e água do mar apresentam algumas UTOS compartilhadas pressupondo que a transmissão de algumas zooxantelas pode ter ocorrido de maneira horizontal. De qualquer forma, a transmissão de zooxantelas a partir da água do mar circundante não implica que esse seja o modo exclusivo de transmissão, sendo possível que algumas zooxantelas possam ser transmitidas verticalmente via ovos ou larvas, como observado por Ryland (1997).

Stat *et al.* (2008) discutiram que os mecanismos pelos quais os corais adquirem suas zooxantelas influenciam fortemente na diversidade desses simbioses. Resultados desses autores sugerem que genótipos de *Symbiodinium* de corais com transmissão vertical são altamente espécie-específicos. Segundo Karako-Lampert *et al.* (2004), corais com transmissão materna de zooxantelas apresentam semelhança na diversidade dos simbioses e abrigam preferencialmente zooxantelas do clado C. Além disso, em corais que apresentam

transferência materna de simbiontes, espera-se que haja uma menor diversidade de simbiontes comparada a corais nos quais as larvas ou juvenis capturam as diversas zooxantelas do ambiente (DOUGLAS, 1998; GAITHER; ROWAN, 2010). Assim, sugere-se que, provavelmente, *P. caribaeorum* e *P. variabilis*, altamente específicos para o clado C, adquirem esse simbiote por transmissão vertical, embora acreditemos que transmissão horizontal também possa ocorrer.

De acordo com Ryland (1997), a transmissão de zooxantelas em *Zoanthus* é exclusivamente horizontal permitindo uma maior diversidade de *Symbiodinium* em seus tecidos. Segundo esse autor, as larvas de *Zoanthus* são azooxanteladas e os pólipos adquirem seus simbiontes a partir do ambiente. Esse resultado foi corroborado na presente pesquisa, onde *Z. sociatus* apresentou maior diversidade de *Symbiodinium*. Além disso, uma UTO foi compartilhada entre água e esse zoantídeo reforçando a hipótese da transmissão horizontal.

A ausência de UTOs exclusivas na água do mar e a presença de algumas UTOs encontradas somente nos zoantídeos levanta a questão se a simbiose é realmente obrigatória para a sobrevivência das zooxantelas. Sabe-se que alguns endossimbiontes podem viver fora de seus hospedeiros por pelo menos um curto período de tempo, isso é evidenciado pelo fato de muitas larvas de corais serem azooxanteladas, adquirindo seus simbiontes do meio externo (LEWIS; COFFROTH, 2004). Entretanto, atualmente é consenso que os endossimbiontes de alguns corais estão intimamente envolvidos na fisiologia do hospedeiro e esses simbiontes não podem sobreviver independentemente, sendo simbiontes obrigatórios. Nesse caso, a transmissão vertical seria o modo de aquisição dessas zooxantelas. Esse fato poderia explicar a ausência de UTOs exclusivas na água do mar, e a presença de algumas UTOs exclusivas nos zoantídeos, levando a crer que essa simbiose seja obrigatória e esses organismos sejam passados de geração a geração por transmissão vertical.

Entretanto, somente estudos aprofundados abordando a diversidade de zooxantelas desde o estágio larval desses animais e uma comparação com as zooxantelas em amostras de água do mar poderiam elucidar a real forma de aquisição desses simbiontes.

De qualquer modo, essa pesquisa revelou dados importantes sobre a simbiose entre dinoflagelados e zoantídeos, ajudando na compreensão da ecologia da simbiose de corais brasileiros. O conhecimento da habilidade dos corais em abrigar zooxantelas de diversos tipos pode ajudar na compreensão sobre a capacidade de sobrevivência desses animais frente ao aquecimento global.

6. CONCLUSÕES

- Os Zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* e *Protopalythoa variabilis* apresentaram o clado C1;
- O zoantídeo *Zoanthus sociatus* foi o único que apresentou o clado A;
- Os clados encontrados provavelmente conferem maior resistência aos hospedeiros frente a fatores ambientais adversos, contribuindo com a grande distribuição geográfica dos zoantídeos.
- As zooxantelas encontradas nos zoantídeos são semelhantes às encontradas para as mesmas espécies em diversas partes do mundo, indicando que colônias geograficamente separadas da mesma espécie podem apresentar os mesmos simbiontes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi o primeiro estudo a revelar a grande diversidade de simbioses em zoantídeos brasileiros. Estudos como estes ainda são escassos no Brasil e merecem atenção, principalmente frente à atual pressão sofrida pelos ambientes costeiros.

O estudo de micro-organismos associados aos corais tem ajudado a elucidar muitas questões sobre a ecologia desses animais, gerando informações importantes que podem auxiliar na conservação de ambientes recifais em todo o mundo. Os avanços na biologia molecular, com o desenvolvimento de técnicas modernas para o estudo de diversas áreas da biologia têm contribuído enormemente com esse conhecimento. Esses avanços, ironicamente, são coincidentes com o declínio de muitos ecossistemas, incluindo os recifes de coral que, mesmo com sua enorme importância ecológica e bioquímica, ainda são escassamente estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-UTAIBI, A. A.; NIAZ, G. R.; AL-LIHAIBI, S. S. Mycosporine-like amino acids in six scleractinian coral species. **Oceanologia**, n. 51, v. 1, pp. 93–104, fev. 2009.
- ALLEMAND, D., FURLA, P.; BÉNAZET-TAMBUTTE, S. Mechanisms of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa. **Canadian Journal of Botany**, n. 76, p. 925–41, jan. 1998.
- ALLGAIER, M.; UPHOFF, H.; FELSKE, A.; WAGNER-DÖBLER, I. Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. **Applied Environmental Microbiology**, n. 69, p. 5051–5059, jan. 2003
- AMARAL, F. D.; COSTA, C. F. Zooxantelas dos hidrocorais *Millepora alcicornis* e *Millepora braziliensis* e dos corais *Favia gravida* e *Siderastrea stellata* de Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, n. 26, v.1, p. 123-133, 2008.
- ANNENKOVA, N. V.; LAVROV, D. V.; BELIKOVA, S. I. Dinoflagellates Associated with Freshwater Sponges from the Ancient Lake Baikal. **Protist**, v. 162, p. 222–236, abr. 2011.
- APPRILL, A. M.; GATES, RUTH D. Recognizing diversity in coral symbiotic dinoflagellate communities. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 6, p. 1127-34, mar. 2007.
- APPRILL, A.; MARLOW, H. Q.; MARTINDALE, M. Q.; RAPPÉ, M. S. The onset of microbial associations in the coral *Pocillopora meandrina*. **The ISME journal**, v. 3, n. 6, p. 685-99, jun. 2009.
- AZAM, F.; FENCHE, T.; FIELD, J. G.; GRA, J. S.; THINGSTAD, F. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257-263, jan. 1983.
- BABCOCK, R. C.; RYLAND, J. S. Larval development of a tropical Zoanthid (*Palythoa* sp.). **Invertebrate Reproduction and Development**, n. 17, v. 3, p. 229-236, jan. 1990.
- BAK, R. P. M.; JOENJE, M.; DE JONG, I.; LAMBRECHTS, D. Y. M.; NIEUWLAND, G. Bacterial suspension feeding by coral reef benthic organisms. **Marine Ecology Progress Series**, n. 175, p. 285–288, dez. 1998.
- BAKER, A. C. Reef corals bleach to survive change. **Nature**, n. 411, p. 765-766, jun. 2001.
- BAKER, A. C. Flexibility and specificity in coral algal symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium*. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 661-689, nov. 2003.
- BANASZAK, A. T.; LAJEUNESSE, T. C.; TRENCH, R. K. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured symbiotic dinoflagellates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 249, p. 219–233, mar. 2000.

BANIN, E.; ISRAELY, T.; FINE, M.; LOYA, Y.; ROSENBERG, E. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. **FEMS Microbiology Letters**, n. 199, p. 33–37, mai. 2001.

BANIN, E.; VASSILAKOS, D.; ORR, E.; MARTINEZ, R. J.; ROSENBERG, E. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. **Current Microbiology**, n. 46, p. 418–422, jun. 2003

BARBOSA, C. F.; SILVA, P. O.; SEOANE, J. C. S.; FERREIRA, B. P.; CORDEIRO, R. C.; GOMES, A. S.; TURCO, B. J. **Diagnóstico de saúde de ecossistemas recifais brasileiros com base em foraminíferos**. In: FERREIRA, B. P.; MAIDA, M. (Org.). **Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil. Situação Atual e Perspectivas**. 1ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p. 1-120.

BAUMAN, A. G.; BURT, J. A.; FEARY, D. A.; MARQUIS, E.; USSEGLIO, P. Tropical harmful algal blooms: An emerging threat to coral reef communities?. **Marine Pollution Bulletin**, n. 60, v. 11, p. 2117-2122, set. 2010.

BAUMS, I. B.; JOHNSON, M. E.; DEVLIN-DURANTE, M. K.; MILLER, M. W. Host population genetic structure and zooxanthellae diversity of two reef-building coral species along the Florida Reef Tract and wider Caribbean. **Coral Reefs**, v. 29, n. 4, p. 835-842, 16 jun. 2010.

BAYER, F.M. **The Shallow-Water Octocorallia of the West Indian Region. A Manual for Marine Biologists**. 1 ed. The Hague: Martinus Nejhoff, 1961. 400p.

BENLLOCH, S.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 18, p.267–279, abr. 1995.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, abr. 1996.

BERKELMANS, R.; VAN OPPEN, M. J. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a “nugget of hope” for coral reefs in an era of climate change. **Proceedings Biological Sciences**, v. 273, n. 1599, p. 2305-12, set. 2006.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, n. 8, p.1162–1174, ago. 2005

BRINKHOFF, T.; BACH, G.; HEIDORN, T. Antibiotic Production by a Roseobacter Clade-Affiliated Species from the German Wadden Sea and Its Antagonistic Effects on Indigenous Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2560-2565, abr. 2004.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 968p.

- BRÜCK, T. B.; BRÜCK, W. M.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z.; MCCARTHY, P. J.; KERR, R. G. Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 561-76, mai. 2007.
- BUCHAN, A.; MORAN, M. A. Overview of the Marine Roseobacter Lineage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5665-5677, out. 2005.
- BURGHARDT, I.; STEMMER, K.; WÄGELE, H. Symbiosis between *Symbiodinium* (Dinophyceae) and various táxons of Nudibranchia (Mollusca: Gastropoda), with analyses of long-term retention. **Organisms, Diversity & Evolution**, n. 8, p. 66–76, abr. 2008.
- CARLOS, A. A.; BAILLIE, B. K.; KAWACHI, M.; MARUYAMA. Phylogenetic position of *Symbiodinium* (Dinophyceae) isolates from Tridacnids (Bivalvia), Cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. **Journal of Phycology**, n. 35, p. 1054–1062, mar. 1999.
- CARVALHO, C. C. C. R. DE; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705-27, jan. 2010.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. A bleaching event on a Brazilian coral reef. **Revista Brasileira de Oceanografia**, n. 47, p. 87-90, mar. 1999 .
- CEH, J.; KEULEN, M. V.; BOURNE, D. G. Coral-associated bacterial communities on Ningaloo Reef, Western Australia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 1, p. 134–144, Jan. 2011.
- CHEN, M. C.; CHENG, Y. M.; SUNG, P. J.; KUO, C. E.; FANG, L. S. Molecular identification of Rab7 (ApRab7) in *Aiptasia pulchella* and its exclusion from phagosomes harboring zooxanthellae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 308, p. 586–595, ago. 2003.
- CHEN, C. A.; YANG, Y.-W.; WEI, N. V.; TSAI, W.-S.; FANG, L.-S. Symbiont diversity in scleractinian corals from tropical reefs and subtropical non-reef communities in Taiwan. **Coral Reefs**, v. 24, n. 1, p. 11-22, 30 dez 2005.
- CHIMETTO, L A; BROCCHI, M; GONDO, M.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1818-26, jun. 2009.
- CHIMETTO, L. A; BROCCHI, M.; THOMPSON, C. C; MARTINS, R. C. R.; RAMOS, H. R.; THOMPSON, F. L. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 312-9, set. 2008.
- CHIMETTO, L. A.; CLEENWERCK, I.; THOMPSON, C. C.; BROCCHI, M.; WILLEMS, A.; VOS, P. D.; THOMPSON, F. L. *Photobacterium jeanii* sp. nov., isolated from corals and zoanthids. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2843-8, dez. 2010.

CHIU, J. M. Y.; LI, S.; LI, A.; PO, B.; ZHANG, B.; SHIN, P. K. S.; QIU, J. Bactéria associated with skeletal tissue growth anomalies in the coral *Platygyra carnosus*. **FEMS Microbial Ecology**, n. 79, p. 380–391, nov. 2012.

COFFROTH, M. A.; POLAND, D. M.; PETROU, E. L.; BRAZEAU, D. A.; HOLMBERG, J. C. Environmental Symbiont Acquisition May Not Be the Solution to Warming Seas for Reef-Building Corals. **PLoS ONE**, n. 5, v. 10, p. 1-7, out. 2010.

COOK, C. B.; D'ELIA, C. F. Are natural populations of zooxanthellae ever nutrient-limited? *Symbiosis*, n. 4, p. 199–212, jan. 1987.

COONEY, R. P.; PANTOS, O.; TISSIER, M. D. A LE; BARER, M. R.; O'DONNELL, A. G.; BYTHELL, J. C. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 401-13, jul. 2002.

COOPER, T. F.; BERKELMANS, R.; ULSTRUP, K. E.; WEEKS, S.; RADFORD, B. Environmental Factors Controlling the Distribution of Symbiodinium Harboured by the Coral *Acropora millepora* on the Great Barrier Reef. **PLoS ONE**, n. 6, v. 10, p; e25536, out. 2011.

COSTA, F. C. **Estudo Eco-fisiológico e molecular dos dinoflagelados simbiotes de *Siderastrea stellata* Verril, 1868 (Cnidaria, Scleractinia) dos recifes costeiros da praia do Cabo Branco, Paraíba – Brasil.** 2006. 156f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

COSTA, C. F. ; AMARAL, F. D.; SASSI, R. Branqueamento em *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) da paraia de Gaibu, Pernambuco, Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 15, n. 1, p. 15-22, 2001.

COSTA, C. F.; SASSI, R.; GORLACH-LIRA, K. Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 367, n. 2, p. 149-152, dec. 2008

COSTA, C. F.; SASSI, R.; AMARAL, F. D. Population density and photosynthetic pigment content in symbiotic dinoflagellates in the Brazilian scleractinian coral *Montastrea cavernosa* (Linnaeus, 1767). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 2, p. 93-99, jun. 2004.

COUTINHO, R. **Bentos de Costões Rochosos.** In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. (eds.). **Biologia Marinha**, 1ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 147-157.

DENOVARO, R.; FRASCHETTI, S. Meiofaunal vertical zonation on hard-bottoms: comparison with soft-bottom meiofauna. **Marine Ecology Progress Series**, v. 230, p. 159-169, abr. 2002.

DIMOND, J.; CARRINGTON, E. Symbiosis regulation in a facultatively symbiotic temperate coral: zooxanthellae division and expulsion. **Coral Reefs**, v. 27, n. 3, p. 601-604, fev. 2008.

DOUGLAS A. E. Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. **Heredity**, n. 81, v. 6, p.599–603, dez. 1998.

DUTRA, L. X. M.; KIKUCHI, R. K. P.; LEÃO, Z. M. A. N. Thirteen months monitoring coral bleaching on Bahia's north coast, Brazil. **Proceedings of International Coral Reef Symposium**, n. 9, v. 1, p. 373, out. 2000.

EDMUNDS, P. J; DAVIES, S. P. An energy budget for *Porites porites* (Scleractinia). **Marine Biology**, n. 92, v. 3, p.339–347, ago. 1986.

EDMUNDS, P.J.; GATES, R.D.; GLEASON, D.F. The biology of larvae from the reef coral *Porites astreoides*, and their response to temperature disturbances. **Marine Biology**, n. 139, p.981–989, jul. 2001.

ENRÍQUEZ, S; MENDEZ, E. R.; IGLESIAS-PRIETO, R. Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. **Limnology and Oceanography**, n. 50, v. 4, p. 1025, jul. 2005.

FABRICIUS, K. E.; MIEOG, J. C.; COLIN, P. L.; IDIP, D.; VAN OPPEN, M J H VAN. Identity and diversity of coral endosymbionts (zooxanthellae) from three Palauan reefs with contrasting bleaching, temperature and shading histories. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 8, p. 2445-58, ago. 2004.

FAGOONEE, I. H. B; WILSON, M. P.; HASSELL, B; TURNER, J. R. The dynamics of zooxanthellae populations: a long-term study in the field. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 843-845, fev. 1999.

FALKOWSKI, P. G.; DUBINSKY, Z.; MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Light and bioenergetics of a symbiotic coral. **Bioscience**, n. 34, p.705–709, dez. 1984.

FAY, S. A.; WEBER, M. X.; LIPPS, J. H. The distribution of *Symbiodinium* diversity within individual host foraminifera. **Coral Reefs**, v. 28, p. 717–726, jun. 2009.

FERRIER-PAGES, C.; ALLEMAND, D.; GATTUSO, J. P.; JAUBERT, J.; RASSOULZADEGAN, F. Microheterotrophy in the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*: effects of light and ciliate density. **Limnology and Oceanography**, n. 43, v. 7, p. 1639–1648, jun. 1998.

FITT, W. K.; SPERO, H. J.; HALAS, J.; WHITE, M. W.; PORTER, J. W. Recovery of the coral *Montastrea annularis* in the Florida Keys after the 1987 Caribbean “Bleaching event”. **Coral Reefs**, v. 12, n. 2, p. 57 - 64, abr. 1993.

FITT, W. K.; TRENCH, R. K. Endocytosis of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* freudenthal by endodermal cells of the scyphistomae of *Cassiopeia xamachana* and resistance of the algae to host digestion. **Journal of Cell Science**, n. 64, p. 195-212, nov. 1983.

FINNEY, J. C.; PETTAY, D. T.; SAMPAYO, E. M.; WARNER, M. E.; OXENFORD, H. A.; LAJEUNESSE, T. C. The Relative Significance of Host–Habitat, Depth, and Geography on the Ecology, Endemism, and Speciation of Coral Endosymbionts in the Genus *Symbiodinium*. **Microbial Ecology**, n. 1, v. 60, p. 250-263, mai, 2010.

FORÊT, S.; KASSAHN, K. S.; GRASSO, L. C. et al. Genomic and microarray approaches to coral reef conservation biology. **Coral Reefs**, v. 26, n. 3, p. 475-486, fev. 2007.

FRANCINI-FILHO, RONALDO B; MOURA, RODRIGO L; THOMPSON, FABIANO L. REIS, R. M.; KAUFMAN, L.; KIKUCHI, R. K. P.; LEÃO, Z. M. A. N. Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 1008-14, mai. 2008.

FRIAS-LOPEZ, J.; ZERKLE, A. L.; BONHEYO, G. T.; FOUKE, B. W. Partitioning of Bacterial Communities between Seawater and Healthy , Black Band Diseased , and Dead Coral Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2214-2228, mai. 2002.

FUHRMAN, J. A.; OOVERNEY, C. C. Marine microbial diversity studied via rRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. **Aquatic Ecology**, n. 32, p. 3-15, set. 1998.

FURLA, P.; ALLEMAND, D.; SHICK, J. M. et al. The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 4, p. 595-604, ago. 2005.

GAITHER, M. R.; ROWAN, ROB. Zooxanthellar symbiosis in planula larvae of the coral *Pocillopora damicornis*. **Journal of experimental Marine Biology and Ecology**, v. 386, n. 1-2, p. 45-53, 30 abr. 2010.

GARREN, M.; RAYMUNDO, L.; GUEST, J.; HARVELL, C. D.; AZAM, F. Resilience of Coral-Associated Bacterial Communities Exposed to Fish Farm Effluent. **PLoS One**, n. 4, v. 10, p.1-9, out. 2009.

GARREN, M.; WALSH, S. M.; CACCONE, A.; KNOWLTON, NANCY. Patterns of association between *Symbiodinium* and members of the *Montastraea annularis* species complex on spatial scales ranging from within colonies to between geographic regions. **Coral Reefs**, v. 25, n. 4, p. 503-512, ago. 2006.

GILBERT, J. A.; DUPONT, C. L. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 347-371, jan. 2011.

GLYNN, P. W. **Global Ecological Consequences of the 1982-1983 El-Niño Southern Oscillations**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Oceanography, 1990. 563p.

GLYNN, P. W.; MATE, J. L.; BAKER, A. C.; CALDERON, M. O. Coral bleaching and mortality in Panamá and Ecuador during the 1997–1998 El Niño-Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982–1983 event. **Bulletin of Marine Science**, n.69, p. 79–109, ago. 2001.

GONZÁLEZ, J. M.; KIENE, R. P.; MORAN, M. A. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3810-3819, set. 1999.

- GONZÁLEZ, J. M.; SIMÓ, R.; MASSANA, R.; COVERT, J. E.; CASAMAYOR, E. O.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MORAN, A. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. **Applied Environmental and Microbiology**, n. 66, p.4237–4246, jun. 2000.
- GOMEZ, F. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. **Acta botanica croatica**, n. 64, v.1, p. 129-212, jan. 2005.
- GÓMEZ-CABRERA, M. D. C.; ORTIZ, J. C.; LOH, W. K. W.; WARD, S.; HOEGH-GULDBERG, O. Acquisition of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) by juveniles of the coral *Acropora longicyathus*. **Coral Reefs**, n. 27, p. 219–226, jun. 2008.
- GÄRTNER, A.; BLÜMEL, M.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 3, p. 421-35, out. 2011.
- GOREAU, T. The physiology of skeleton formation in corals. II. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. **Biological Bulletin**, n. 116, p. 59–75. 1959.
- HASLER, H.; OTT, J. A. Diving down the reefs? Intensive diving tourism threatens the reefs of the northern Red Sea. **Marine Pollution Bulletin**, n. 56, v. 10, p. 1788–1794, ago. 2008.
- HARDIMAN, N.; BURGIN, S. Recreational impacts on the fauna of Australian coastal marine ecosystems. **Journal of Environmental Management**, n. 91, v. 11, p. 2096-2108, nov. 2010.
- HENNIGE, S. J.; MCGINLEY, M. P.; GROTTOLI, A. G.; WARNER, M. E. Photoinhibition of *Symbiodinium* spp. within the reef corals *Montastraea faveolata* and *Porites astreoides*: implications for coral bleaching. **Marine Biology**, v. 158, n. 11, p. 2515-2526, 29 jul. 2011.
- HENTSCHER, U.; SCHMID, M.; WAGNER, M.; FIESELER, L.; GERNERT, C.; HACKER, J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 35, p. 305-312, mai. 2001.
- HILL, M.; ALLENBY, A.; RAMSBY, B.; SCHÖNBERG, C.; HILL, A. *Symbiodinium* diversity among host clonid sponges from Caribbean and Pacific reefs: Evidence of heteroplasmy and putative host-specific symbiont lineages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 81-8, abr. 2011.
- HILL, M.; HILL, A.; LOPEZ, N.; HARRIOTT, O. Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). **Marine Biology**, v. 148, n. 6, p. 1221-1230, 15 nov. 2005.
- HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZA, A. et al. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 360-371, nov. 2004.

HOEGH-GULDBERG, O.; SMITH, G. J. Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. **Marine Ecology Progress Series**, n. 57, p. 173–186, mar. 1989.

HOOGENBOOM, M.; BERAUD, E.; FERRIER-PAGÈS, C. Relationship between symbiont density and photosynthetic carbon acquisition in the temperate coral *Cladocora caespitosa*. **Coral Reefs**, v. 29, n. 1, p. 21-29, 5 nov. 2009.

HUGHES, T. P.; BAIRD, A. H.; BELLWOOD, D. R.; HUGHES, T. P.; BAIRD, A. H.; BELLWOOD, D. R.; CARD, M.; CONNOLLY, S. R.; FOLKE, C.; GROESBERG, R.; HOEGH-GULDBERG, O.; JACKSON, J. B. C.; KLEYPAS, J.; LOUGH, J. M.; MARSHALL, P.; NYSTRÖM, M.; PALUMBI, S. R.; PANDOLFI, J. M.; ROSEN, B.; ROUGHGARDEN, J. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science**, n. 301, v. 5635, p. 929–933, ago. 2003.

HUNTER, E. M.; MILLS, H. J.; KOSTKA, J. E. Microbial community diversity associated with carbon and nitrogen cycling in permeable shelf sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5689-701, set. 2006.

JENSEN, S.; NEUFELD, J. D.; BIRKELAND, N. K.; HOVLAND, M.; MURRELL, J. C. Insight into the microbial community structure of a Norwegian deep-water coral reef environment. Deep Sea Research Part I. **Oceanographic Research Papers**, v. 55, n. 11, p. 1554-1563, nov. 2008.

JONES R. J.; YELLOWLEES D. Regulation and control of intracellular algae (equals zooxanthellae) in hard corals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, n. 352, p. 457–468, ago. 1997.

KALIMUTHO, M.; AHMAD, A.; KASSIM, Z. Isolation, Characterization and Identification of Bactéria associated with mucus of *Acropora cervicornis* coral from Bidong Island. **Malaysian Journal of Science**, v. 26, n. 2, p. 27-39, out. 2007.

KAN, J.; EVANS, S.; CHEN, F.; SUZUKI, M. Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 51, n. 1, p. 55-66, mai. 2008.

KAPLAN, R. H. **Southeastern and Caribbean Seashores**. 1ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1988. 480p.

KARAKO-LAMPERT, S.; KATCOFF, D. J.; ACHITUV, Y.; DUBINSKY, D.; STAMBLER, N. Do clades of symbiotic dinoflagellates in scleractinian corals of the Gulf of Eilat (Red Sea) differ from those of other coral reefs? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 311, p. 301-314, jul. 2004.

KAUL P. N.; FARMER M. R.; CIERESZKO L. S. Pharmacology of palytoxin: The most potent marine toxin known. **Proceed West Pharmacology Society**, n. 17, p., 294, jan. 1974.

KIKUCHI, R. K. P.; LEÃO, Z. M. A. N.; OLIVEIRA, M. D. M.; DUTRA, L. X. C.; CRUZ, I. C. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia associado aos efeitos do El Niño 2003. *In:*

CONGRESSO DE PLANEJAMENTO E GESTÃO DAS ZONAS COSTEIRAS DOS PAÍSES DE EXPRESSÃO PORTUGUESA, 6, 2004, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2004. p. 213.

KINZIE, R. A.; TAKAYAMA, M.; SANTOS, S. R.; COFFROTH, M. A. The adaptive bleaching hypothesis: experimental tests of critical assumptions. **The Biological bulletin**, v. 200, n. 1, p. 51-8, fev. 2001.

KIRKENDALE, L. Their Day in the Sun : molecular phylogenetics and origin of photosymbiosis in the “other” group of photosymbiotic marine bivalves (Cardiidae:Fraginae). **Biological Journal of the Linnean Society**, p. 448-465, nov. 2009.

KNOWLTON, N.; ROHWER, F. Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. **American Naturalist**, n. 162, v. 4, p. 51–62, out. 2003.

KOLBER, Z. S.; PLUMLEY, S. G.; LANG, A. S.; BEATTY, J. T.; BLANKENSHIP, R. E.; VANDOVER, C. L.; VETRIANI, C.; KOBLIZEK, M.; RATHGEBER, C.; FALKOWSKI, P. G. Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bactéria to the Carbon Cycle in the Ocean. **Science**, v. 292, n. 5526, p. 2492-2495, jun. 2001.

KOOPERMAN, N.; BEN-DOV, E.; KRAMARSKY-WINTER, E.; BARAK, Z.; KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, n. 1, p. 106-13, nov. 2007.

KUO, J.; CHEN, M.-C.; LIN, C.-H.; FANG, L.-S. Comparative gene expression in the symbiotic and aposymbiotic *Aiptasia pulchella* by expressed sequence tag analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, n. 1, p. 176-86, 21 mai. 2004.

LABOREL, J. Les peuplements de madréporaires des cotes tropicales du Brésil. **Annals of the University Abidjan, Serie E**, vol. 2, n. 3, p. 1-261, 1969.

LAJEUNESSE, T. C. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. **Journal of Phycology**, v. 880, p. 866-880, mai. 2001.

LAJEUNESSE, T. C. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. **Marine Biology**, n. 141, p. 387-400, mai. 2002.

LAJEUNESSE, T. C.; BHAGOOLI, R.; HIDAKA, M.; DONE, T.; DEVANTIER, L.; SCHMIDT, G. W.; FITT, W. K.; HOEGH-GULDBERG, O. Closely-related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance within coral reef host communities across environmental, latitudinal, and biogeographic gradients. **Marine Ecology Progress Series**, n. 284, p. 147-161, set. 2004(a).

LAJEUNESSE, T. C.; LOH, W. K. W.; VAN WOESIK, R.; HOEGH-GULDBERG, O.; SCHMIDT, G. W.; FITT, W. K. Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals relative to those of the Caribbean. **Limnology and Oceanography**, n. 48, p. 2046-2054, abr. 2003.

- LAJEUNESSE, T. C.; THORNHILL, D. J.; COX, E.; STANTON, F.; FITT, W. K.; SCHMIDT, G. W. High diversity and host specificity observed among symbiotic dinoflagellates in reef coral communities from Hawaii. **Coral Reefs**, n. 23, p. 596-603, set. 2004(b).
- LAJEUNESSE, T. C.; REYES-BONILLA, H.; WARNER, M. E.; WILLS, M.; SCHMIDT, G. W.; FITT, W. K. Specificity and stability in high latitude eastern Pacific coral-algal symbioses. **Limnology and Oceanography**, n. 53, p. 719-727, 2008.
- LAJEUNESSE, T.C.; FINNEY, J. C.; SMITH, R.; OXENFORD, H. Outbreak and persistence of opportunistic symbiotic dinoflagellates during the 2005 Caribbean mass coral "bleaching" event. **Proceeding of Royal Society of London**, n. 276, p. 4139-4148, set. 2009.
- LAJEUNESSE, T. C.; LOH, W. K. W.; TRENCH, R. K. Do introduced endosymbiotic dinoflagellates 'take' to new hosts? **Biological Invasions**, n. 11, p. 995-1003, jan. 2009.
- LAJEUNESSE, T. C.; PETTAY, T.; PHONGSUWAN, N.; BROWN, B.; OBURA, D.; HOEGH-GULDBERG, O.; FITT, W. K. Special Paper: Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. **Journal of Biogeography**, n. 37, p. 785-800, mai. 2010.
- LALEV, A I.; NAZAR, R. N. Conserved core structure in the internal transcribed spacer 1 of the *Schizosaccharomyces pombe* precursor ribosomal RNA. **Journal of molecular biology**, v. 284, n. 5, p. 1341-51, 18 dez. 1998.
- LAMPERT, Y.; KELMAN, D.; DUBINSKY, Z.; NITZAN, Y.; RUSSELL T. Diversity of culturable bacteria in the mucus of the Red Sea coral *Fungia scutaria*. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 58, v. 1, p. 99-108, out. 2006.
- LAMPERT, Y.; KELMAN, D.; NITZAN, Y.; DUBINSKY, Z.; BEHAR, A.; HILL, R. T. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. **Microbial Ecology**, n. 64, v.2, p. 187-198, mar. 2008.
- LEÃO, Z. M. A. N. **Guia para identificação dos corais do Brasil**. 1ed. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1986. 57p.
- LEÃO, Z. A. M. N. **The Coral Reefs of southern Bahia**. In: HETZEL, B., CASTRO, C. B. (EDS.). **Corals of southern Bahia**. 1ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1994. p. 151-159.
- LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; OLIVEIRA, M. D. M. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. **Biota Neotrópica**, n. 8, v. 3, p. 69-82, set. 2008.
- LEÃO, Z. A. M. N.; DOMINGUEZ, J. M. L. Tropical cost of Brasil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 1-6, p. 112-122, ago. 2000
- LEWIS, C. L.; COFFROTH, M. A. The acquisition of exogenous algal symbionts by an octocoral after bleaching. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1490-2, 4 jun. 2004.

LI, C. Q.; LIU, W. C.; ZHU, P.; YANG, J. L.; CHENG, K. D. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. **Microbial ecology**, v. 62, n. 4, p. 800-12, nov. 2011.

LINS-DE-BARROS, M.M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; MONTEIRO, V. A.; TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B. Archaea, Bacteria, and Algal Plastids Associated with the Reef-Building Corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, n. 59, v. 3, p.523–532, dez. 2010.

LITTLE, A. F.; VAN OPPEN, M. J.; WILLIS, B. L. Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1492-4, 4 jun. 2004.

LOH, W. K. W.; LOI, T.; CARTER, D.; HOEGH-GULDBERG, O. Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora hystrix* and *Acropora longicyathus* in the Indo-West Pacific. **Marine Ecology Progress Series**, v. 222, p. 97-107, nov. 2006.

LOH, W. K. W.; LOI, T.; CARTER, D.; HOEGH-GULDBERG, O. Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora hystrix* and *Acropora longicyathus* in the Indo-West Pacific. **Marine Ecology Progress Series**, v. 222, p. 97–107, nov. 2001.

LUNA, G M; BIAVASCO, F; DANOVARO, R. Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1851-1857, jul. 2007.

LUNA, G. M.; BONGIORNI, L.; GILI, C.; BIAVASCO, F.; DANOVARO, R. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 1, p. 120-127, 21 dez. 2010.

LUNA, B.; PÉREZ, C. V.; SÁNCHEZ-LIZASO, J. L. Benthic impacts of recreational divers in a Mediterranean Marine Protected Area. **Journal of Marine Science**, n. 66, v. 3, p. 517-523, fev. 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12 ed, São Paulo: Artmed, 2010. 1160p.

MAGALON, H.; FLOT, J. F.; BAUDRY, E. Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in Pacific corals in the genus *Pocillopora*. **Coral Reefs**, v. 26, n. 3, p. 551-558, mar. 2007.

MARHAVER, K. L.; EDWARDS, R. A.; ROHWER, F. Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental Microbiology**, n. 10, v. 9, p. 2277–2286, set. 2008.

MARTÍNEZ-GARCIA, M.; DÍAS-VALDÉS, M.; ANTÓN J. Diversity of pufM genes, involved in aerobic anoxygenic photosynthesis, in the bacterial communities associated with colonial ascidians. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 71, v. 3 , p. 387-398, set. 2010.

MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; DÍAZ-VALDÉS, M.; WANNER, G.; RAMOS-ESPLÁ, A.; ANTÓN, J. Microbial community associated with the colonial ascidian *Cystodytes dellechiajei*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 521-34, fev. 2007.

MASON, O. U.; NAKAGAWA, T.; ROSNER, M.; NOSTRAND, J. D. V.; ZHOU, J.; MARUYAMA, A.; FISK, M. R.; GIOVANNONI, S. J. First investigation of the microbiology of the deepest layer of ocean crust. **PLoS one**, v. 5, n. 11, p. e15399, nov. 2010.

MATTHEWS-CASCON, H., LOTUFO, T. M. C. **Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará**. 1ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 248p.

MAYAL, E. M.; FERREIRA, V. P.; SIAL, A. N. **Bleaching in northeast Brazil reefs**. In: Proceeding, Workshop Osnlr-locaribe-Brasil. Recife. 1997. p. 14

MAYAL, E. M.; SIAL, A. N.; FERREIRA, V. P. **O branqueamento como fator indicativo de impacto ambiental**. In: Proceedings, I Simpósio Universidade e Meio Ambiente no Nordeste-Ensino: Pesquisa, Extensão. Recife. 1995. p. 20.

MAYFIELD, A. B.; GATES, RUTH D. Osmoregulation in anthozoan-dinoflagellate symbiosis. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 147, n. 1, p. 1-10, mai. 2007.

MENEZES, C. B. A; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTTO, P. B.; PASSARINI, M. R.; SILVA, C. H.; JUSTO. M. R.; LEAL R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G.; STTTLE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-82, 20 ago. 2010.

MEZITI, A.; KORMAS, K.; PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M.; THESSALOU-LEGAKI, M. Bactérial phylotypes associated with the digestive tract of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the ascidian *Microcosmus* sp. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 33, n. 2, p. 84-91, abr. 2007.

MIGOTTO, A. E. Anthozoan bleaching on the southeastern coast of Brazil - summer 1994. In: 6th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COELENTERATE BIOLOGY, 6, 1997, Netherlands, Programme and Abstracts...Nationaal Natuurhistorisch Museum, 1997. p. 70.

MILLS, H. J.; HUNTER, E.; HUMPHRYS, M. Characterization of nitrifying, denitrifying, and overall bactérial communities in permeable marine sediments of the northeastern Gulf of Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4440-53, jul. 2008.

MINKWITZ, A.; BERG, G. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, v. 1, p. 139-145, jan. 2001.

MITOVA, M.; TOMMONARO, G.; HENTSCHEL U.; MÜLLER, W.; DE ROSA, S. Exocellular cyclic dipeptides from a *Ruegeria* strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. **Marine Biotechnology**, n. 3, p. 95-103, abr. 2004.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Atlas dos recifes de coral nas unidades de conservação brasileiras**. PRATES, A. P. L. (ed.). 1ed. Brasília: Dupligráfica, 2003. 180p.

MOORE, R. E.; HELFRICH, P.; PATTERSON, G. M. L. The deadly seaweed of Hana. **Oceanus**, n. 25, p. 54, mar. 1982.

MOORE, E. J.; GOSLINER, T. M. Molecular phylogeny and evolution of symbiosis in a clade of Indopacific nudibranchs. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, n. 1, p. 116-23, jan. 2011.

MORAIS, J. O. Contribuição ao estudo dos “beach rocks” do Nordeste do Brasil. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 9, n. 11, p. 79-94, jun. 1967.

MUIRHEAD, A.; RYLAND, J. S. A review of the genus *Isaurus* Gray, 1828 (Zoanthidea), including new records from Fiji. **Journal of Natural History**, v. 19, p. 323-335, set. 1985.

MUNN, C. B. **Marine Microbiology: Ecology and Applications**. 1ed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2004. 282 p.

MUSCATINE, L. **The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals**. In: DUBINSKY, Z. (ed.). **Coral reefs**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 75–87.

MUSCATINE, L., FALKOWSKI, P. G.; DUBINSKY, Z.; COOK, P. A.; MCCLOSKEY, L. R. The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, n. 236, v. 1284, p. 311-324, abr. 1989.

MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient poor environments. **BioScience**, n. 27, v. 7, p. 454–460, jul. 1977.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, n. 59, p.695-700, abr. 1993.

NEALE, P.J.; BANASZAK, A.T.; JARRIEL, C.R. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. **Journal of Phycology**, n. 34, p. 928–938, jan. 1998

NISSEN, H.; NISSEN, P.; AZAM, F. Multiphasic uptake of D-glucose by an oligotrophic marine bacterium. **Marine Ecology Progress Series**, n. 16, p. 155–160, fev. 1984.

NEULINGER, S. C.; JÄRNEGREN, J.; LUDVIGSEN, M.; LOCHTE, K.; DULLO, W. C. Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral’s nutrition, health, and distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7272-85, dez. 2008.

NISSIMOV, J.; ROSENBERG, E.; MUNN, C. B. Anti-microbial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 292, v. 2, p. 210–215, jan. 2009.

- OLIVEIRA, F. A. da S. **Estudo da diversidade dos micro-organismos associados a ascídias coloniais (Tunicata, Ascidiacea)**. 2010, 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- OLSON, N. D.; AINSWORTH, T. D.; GATES, R.D.; TAKABAYASHI, M. Diazotrophic bactéria associated with Hawaiian *Montipora* corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 371, n. 2, p. 140-146, abr. 2009.
- OPPEN, M J H VAN; MIEOG, J. C.; SÁNCHEZ, C. A; FABRICIUS, K. E. Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: the roles of geography and host relationships. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2403-17, jul. 2005.
- OPPEN, M. J.; PALSTRA, F. P.; PIQUET, A M.; MILLER, D J. Patterns of coral-dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity. **Proceedings Biological Sciences**, v. 268, n. 1478, p. 1759-67, 7 set. 2001.
- ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L. TORSVIK, V. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelenvannet as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367 - 3373, jan. 1997.
- PACHIADAKI, M. G.; KALLIONAKI, A.; DÄHLMANN, A.; LANGE, G. J.; KONSTANTINOS A. KORMAS. Diversity and Spatial Distribution of Prokaryotic Communities Along A Sediment Vertical Profile of A Deep-Sea Mud Volcano. **FEMS Microbial Ecology**, n. 62, p. 655–668, mai. 2011.
- PÉREZ-MATOS, A. E.; ROSADO, W.; GOVIND, N. S. Bactérial diversity associated with the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 2, p.155-164 ago. 2007.
- PETTAY, D. T.; WHAM, D. C.; PINZÓN, J. H.; LAJEUNESSE, T. C. Genotypic diversity and spatial-temporal distribution of *Symbiodinium* clones in an abundant reef coral. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 24, p. 5197-212, dez. 2011.
- POCHON, X.; PAWLOWSKI, J.; ZANINETTI, L.; ROWAN, R. High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. **Marine Biology**, n. 6, v. 139, p. 1069-1078, jan. 2001.
- POCHON, X.; STAT, M.; TAKABAYASHI, M.; CHASQUI, L.; CHAUKA, L. J.; LOGAN, D. D. K.; GATES, R. D. Comparison of Endosymbiotic and Free-Living *Symbiodinium*(Dinophyceae) Diversity In a Hawaiian Reef Environment. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 1, p. 53–65, fev. 2010.
- RABELO, E. F. **Distribuição Espacial e Interações Competitivas em Zoantídeos (Cnidaria:Zoanthidea) em um Ambiente de Recifes de Arenito no Nordeste do Brasil**. 2007.

117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais)- Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

RABELO, E. F.; MATTHEWS-CASCON, H. Influência da Luz no Comportamento Alimentar de *Isaurus tuberculatus*, Gray 1828 (Cnidaria:Zoanthidae) em Condições de Laboratório. **Arquivos de Ciências do Mar**, n. 40, v. 2, p. 55-58. mar. 2007.

RAINA, J.-B.; TAPIOLAS, D.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3492-501, jun. 2009.

REEF, R.; KANIEWSKA, P.; HOEGH-GULDBERG, O. Coral skeletons defend against ultraviolet radiation. **PLoS one**, v. 4, n. 11, p. e7995, jan. 2009.

REIMER, J. D.; ONO, S.; TSUKAHARA, J.; TAKISHITA, K.; MARUYAMA, T. Non-seasonal clade-specificity and subclade microvariation in symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa: Hexacorallia) at Kagoshima Bay, Japan. **Phycological Research**, v. 55, n. 1, p. 58-65, mar. 2007.

REIMER, J. D.; TAKISHITA, K.; MARUYAMA, T. Molecular identification of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) from *Palythoa* spp. (Anthozoa: Hexacorallia) in Japan. **Coral Reefs**, v. 25, n. 4, p. 521-527, set. 2006.

REIMER, J. D.; TAKISHITA, K.; ONO, S.; MARUYAMA, T.; TSUKAHARA, J. Latitudinal and intracolony ITS-rDNA sequence variation in the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium* (Dinophyceae) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa : Hexacorallia). **Phycological Research**, n. 54 p. 122-132, mai. 2006a.

REIMER J. D.; ONO, J.; TAKISHITA, K.; TSUKAHARA, J.; MARUYAMA, T. Molecular Evidence Suggesting Species in the Zoanthid genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) Are Congeneric. **Zoological Science**, n. 23, v. 1, p. :87-94, jan. 2006b.

REIMER, J. D.; ONO, S.; TSUKAHARA, J.; IWASE, F. Molecular characterization of the zoanthid genus *Isaurus* (Anthozoa: Hexacorallia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) from Japan. **Marine Biology**, v.153, n. 3, p. 351-363, abr. 2008.

REIS, A. M. M.; ARAÚJO, S. D.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS JR., G.; COELHO, A. M. A.; KRÜGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378-87, abr. 2009.

RITCHIE, K. B.; SMITH, G. W. **Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers**. In: ROSENBERG, E.; LOYA, Y. (eds). **Coral Health and Disease**. New York: Springer-Verlag, pp. 259-263. 2004.

ROGER, S. O. BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant-tissues. **Plant Molecular Biology**, v. 5, p. 69 - 76, out. 1985.

ROHLFS, C.; BELÉM, M. J. C. O gênero *Zoanthus* no Brasil. I. Caracterização e revisão anatômica de *Zoanthus sociatus* (Cnidaria, Zoanthinaria, Zoanthidae). **Iheringia**, n. 177, p. 135-144, 1994.

ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 1-10, nov. 2002.

ROSEN, B. R. **Algal symbiosis, and the collapse and recovery of reef communities: Lazarus corals across the K-T boundary.** In: S. J. CULVER.; P. F. RAWSON (eds.), **Biotic response to global change: The last 145 million years**, 1ed. Cambridge: University Press, 2000. p. 164–180.

ROSENBERG, E.; KOREN, O.; RESHEF, L.; EFRONY, R.; ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews**, v. 5, n. 5, p. 355-62, mai. 2007.

ROWAN, R. Review: Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 3, p. 407-41, jun. 1998.

ROWAN, R.; POWERS, D. A. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1348-51, mar. 1991a.

ROWAN, R.; POWERS, D. A. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). **Marine Ecology Progress Series**, v. 71, p. 65-73, mar. 1991b.

RUPPERT, E.E, FOX, R.S; BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology: A functional evolutionary approach.** 7 ed. Belmont: Thomson, 2003. 963p.

RYLAND, J. S. Reproduction in Zoanthidea (Anthozoa: Hexacorallia). **Invertebrate Reproduction & Development**, n. 31, v. 1-3, p. 177-188, jan. 1997.

RYLAND, J. S.; LANCASTER, J. E. Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia:Zoanthidea) in the tropical West pacific. **Invertebrate Systematic**, v. 17, n. 3, p. 407-428, ago. 2003.

RYPIEN, K. L.; WARD, J. R.; AZAM, F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 28-39, jan. 2010.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 1ed. New York: Cold spring Harbor, 2001. 999p.

SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z.; BRÜCK, T. B.; BRÜCK, W. M.; DRUQUE-ALARCÓN, A. P.; MCCARTHY, P. J.; KERR, R. G. The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrhipathes lutkeni*. **The ISME Journal**, v. 1, n. 7, p. 654-659, nov. 2007.

SANTOS, S. R.; COFFROTH, M. A. Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus *Symbiodinium* Freudenthal are haploid. **Biological Bulletin**, n. 204, v. 1, p. 10–20, fev. 2003.

- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 75, v. 23, p. 7537-41, dez. 2009.
- SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S ribosomal RNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, n. 173, p. 4371–4378, mai. 1991.
- SCHMITT, S.; DEINES, P.; BEHNAM, F.; WAGNER, M.; TAYLOR, M. W. Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbial Ecology**, n. 78, p. 497–510, ago. 2011.
- SCHUHMACHER H, ZIBROWIUS H. What is hermatypic? A redefinition of ecological groups in corals and other organisms. **Coral Reefs**, n. 4, p. 1-9, 1985.
- SCHWARZ, J. A.; WEIS, V. M.; POTTS, D. C. Feeding behavior and acquisition of zooxanthellae by planula larvae of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. **Marine Biology**, n. 140, v. 3, p. 471–478, jan. 2002.
- SEBENS, K. P. Intertidal distribution of Zoanths on the Caribbean Coast of Panama: Effects of predation and desiccation. **Bulletin of Marine Science**, n. 32, v. 1, p. 316-335, set. 1982.
- SEKAR, R.; MILLS, D. K.; REMILY, E. R.; VOSS, J. D.; RICHARDSON, L. L. Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5963-73, set. 2006.
- SHAHHOSSEINY, M. H.; MOSTAFAVI, P. G.; FATEMI, S. M.; R.; KARIMI, E. Clade identification of symbiotic zooxanthellae of dominant sclerectinian coral species of intertidal pools in Hengam Island. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 9, p. 1502-1506, fev. 2011.
- SHASHAR, N.; COHEN, Y.; LOYA, Y.; SAR, N. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in stony corals: evidence for coral-bacteria interactions. **Marine Ecology Progress Series**, n. 111, p. 259–264, ago. 1994.
- SHAKUN, J. D.; CLARK, P. U.; HE, F.; MARCOTT, S. A.; MIX, A. C.; ZHENGYU, L.; OTTO-BLIESNER, B.; SCHMITTNER, A.; BARD, E. Global warming preceded by increasing carbon dioxide concentrations during the last deglaciation. **Nature**, v. 484, n. 7392, p. 49-54, abr. 2012.
- SHARON, G.; ROSENBERG, E. Bacterial growth on coral mucus. **Current microbiology**, v. 56, n. 5, p. 481-8, mai. 2008.
- SHEARER, T. L.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, C.; COFFROTH, M. A. Generating molecular markers from zooxanthellate cnidarians. **Coral Reefs**, v. 24, n. 1, p. 57-66, 5 nov. 2004.

SHNIT-ORLAND, M.; KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 3, p. 371-80, mar. 2009.

SIBONI, N.; BEN-DOV, E.; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. Global distribution and diversity of coral-associated Archaea and their possible role in the coral holobiont nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**, n. 10, v. 11, p. 2979–2990, ago. 2008.

SINGLETON, D. R.; MICHELLE, A. F.; STEPHEN, L. R. A.; WILLIAM, B. W. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4374–4376, jan. 2001.

SINNIGER, F.; MONTOYA-BURGOS, J. I.; CHEVALDONNE, P.; PAWLOWSKI, J. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. **Marine Biology**, n. 147, p. 1121–1128, jul. 2005.

SMALL, A. M.; ADEY, W. H. Reef corals, zooxanthellae and free-living algae: a microcosm study that demonstrates synergy between calcification and primary production. **Ecological Engineering**, v. 16, n. 4, p. 443-457, fev. 2001.

SMITH, F. G. W. **Atlantic Reef Corals**. 1ed. Florida: University of Miami Press, 1971, 164 p.

SMITH, G. J.; MUSCATINE, L. Carbon budgets and regulation of the population density of symbiotic algae. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 238, p. 213-238, jan 1986.

SMITH, R. T.; PINZÓN, J. H.; LAJEUNESSE, T. C. *Symbiodinium* (Dinophyta) diversity and stability in aquarium corals. **Journal of Phycology**, n. 45, v. 5, p. 1030–1036, out. 2009.

SOARES, C. L. S.; PÉRE, C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S.; MELO, L. F. A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, v. 4, p. 463-468, out/dez. 2006.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F. Primeiro registro de branqueamento no litoral do Ceará (NE-Brasil): Indicador das mudanças climáticas? **Geociências**, 2012 (*In press*).

SPALDING, D.; RAVILIOUS, C. GREEN, E. P. **World Atlas of Coral Reefs**. 1ed. London: University of California Press, 2001. 432p.

STAT, M.; LOH, W. K. W.; HOEGH-GULDBERG, O.; CARTER, D. A. Symbiont acquisition strategy drives host–symbiont associations in the southern Great Barrier Reef. **Coral Reefs**, v.27, n. 4, p. 763-772, abr. 2008.

STEINKE, M.; BRADING, P.; KERRISON, P.; WARNER, M. E.; SUGGETT, D. J. Concentrations of Dimethylsulfiopropionate and Dimethyl Sulfide are Strain-Specific in Symbiotic Dinoflagellates (*Symbiodinium* sp., Dinophyceae). **Journal of Phycology**, v. 47, n. 4, p. 775-783, ago. 2011.

SUNAGAWA, S.; WOODLEY, C. M.; MEDINA, M. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. 1-7, mar. 2010.

SURAJIT, D.; WARD, L. R.; BURKE, C. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 419-429, nov. 2008.

SWEET, M. J.; CROQUER, A.; BYTHELL, J. C. Dynamics of bacterial community development in the reef coral *Acropora muricata* following experimental antibiotic treatment. **Coral Reefs**, v. 30, n. 4, p. 1121-1133, jul. 2011.

TAIT, E.; CARMAN, M.; SIEVERT, S. M. Phylogenetic diversity of bacteria associated with ascidians in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.342, p.138 - 146, mar. 2007.

TAYLOR, F. J. R.; HOPPENRATH, M.; SILDARRIAGA, J. F. Dinoflagellate diversity and distribution. **Biodiversity and Conservation**, n. 17, v. 2 p. 407-418, set. 2008.

THIEL, V.; LEININGER, S.; SCHMALJOHANN, R.; BRÜMMER, F.; IMHOFF, J. F. Sponge-specific bacterial associations of the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Tetractinomorpha). **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 101-111, jul. 2007.

TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V.; LOYA, Y.; YAMAZATO, K. Degradation and proliferation of zooxanthellae in planulae of the hermatypic coral *Stylophora pistillata*. **Marine Biology**, v. 130, n. 3, p. 471-477, fev. 1998.

TKAVC, R.; AUSEC, L.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, n. 2, p. 310-21, ago. 2011.

TOLLER, W. W.; ROWAN, R.; KNOWLTON, N. Zooxanthellae of the *Montastraea annularis* species complex: patterns of distribution of four taxa of *Symbiodinium* on different reefs and across depths. **The Biological Bulletin**, v. 201, n. 3, p. 348-59, dez. 2001.

TOREN, A.; LANDAU, L.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y.; ROSENBERG, E. Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 64, v. 4, p. 1379-1384, abr. 1998.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em ecologia**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2010. 576p.

TRENCH, R. K. 1987. **Dinoflagellates in non-parasitic symbioses**. In: TAYLOR, F. J. R. (ed.) **The Biology of Dinoflagellates**. 1ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. p. 530-570.

TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; MURICY, G.; CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. M. MARTINS, O. B. Microorganismos Associados a Poríferos. **Biociência**, n. 37:64-69, mai. 2007.

VILLAÇA, R. **Recifes Biológicos**. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A.: **Biologia Marinha**, 1ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 229-248.

VISRAM, S.; DOUGLAS, A. E. Molecular diversity of symbiotic algae (zooxanthellae) in scleractinian corals of Kenya. **Coral Reefs**, v. 25, n. 1, p. 172-176, jan. 2006.

WAGNER-DÖBLER, I.; RHEIMS, H.; FELSKE, A. et al. *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea Alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1177-84, jul. 2004.

WEBSTER, N. S.; BOTTÉ, E. S.; SOO, R. M.; WHALAN, S. The larval sponge holobiont exhibits high thermal tolerance. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 756-762, 11 dez. 2011.

WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H.; ROHWER, FOREST. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2707-19, nov. 2007.

WEIS, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of Symbiosis. **The Journal of Experimental Biology**, n. 211, p. 3059-3066, out. 2008.

WILKE, D. V. ; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C. ; MORAES FILHO, M. O. ; ARAÚJO, R. M. ; SILVA, W.M.B. ; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ FILHO, R ; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic lipidic alpha-aminoacids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1455-1459, jan. 2009.

WILKINSON, C. **Status of coral reefs of the world**. Townsville: Australian Institute of Marine Science, 2002. p.7-44.

WOLFGANG SEIFARTH. **Marine Flatworms of the World**. Disponível em: <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bu6/Introduction11.html>. Acesso em: 20 mar 2012.

YAMASHITA, H.; SUZUKI, G.; HAYASHIBARA, T.; KOIKE, K. Do corals select zooxanthellae by alternative discharge? **Marine Biology**, v. 158, n. 1, p. 87-100, 21 set. 2010.

YELLOWLEES, D.; REES, T. A. V.; LEGGAT, W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 5, p. 679-94, mai. 2008.

ZEHR, J. P., JENKINS, B. D., SHORT, S. M., STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, n. 5, v. 7, p. 539–554, jul. 2003.

APÊNDICE

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continua.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
A01	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	99	HQ703952	Águas termais
E07	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	HQ379140	Crosta oceânica
A02	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	100	HQ703952	Águas termais oceânicas
		Bactéria não cultivável	99	100	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	HQ379140	Crosta oceânica
C07	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
F10	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	GU570643	Água Marinha
F12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HM243628	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	EU394575	Água marinha
A11	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	GQ850554	Água marinha
		<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	99	HQ703952	Águas termais oceânicas
A12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	HQ379140	Crosta oceânica
H10	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ826007	Água marinha
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	AB451772	Águas termais oceânicas
C08	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	JN314436	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	DQ857749	Coral <i>Cirripathes lutkeni</i>
B12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	100	FJ825911	Água marinha
F01	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	GU230304	Água marinha

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
E08	Gammaproteobacteria: Pseudomonadaceae: <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	99	99	JN679860	Água marinha
		<i>Pseudomonas</i> sp.	99	99	AM411620	Água marinha profunda
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF471521	Água de Estuário
		Bactéria não cultivável	99	99	GU118445	Várias espécies de Coral do Caribe
		<i>Roseobacter</i> sp.	99	99	EF092182	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	HE574924	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EF471645	Água de Estuário
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ202722	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
C09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	99	98	FM958454	Cavalo-marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		<i>Thalassobius</i> sp.	99	98	JF895519	Água marinha
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	GQ348517	Branquias de Bivalves de zonas oceânicas profundas
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ716880	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		<i>Ruegeria</i> sp.	99	98	AY258078	Dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203329	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	EU883378	Esponjas <i>Halichondria</i> sp., <i>Haliclona</i> sp., e <i>Xestosp. ongia</i> sp.
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	AF473915	Corais <i>Diploria strigosa</i> , <i>Montastrea annularis</i> e <i>Colpophyllia natans</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	98	HM100822	Esponja <i>Halichondria okadai</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	GU584531	Sedimento marinho

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
E05	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	98	HQ703952	Águas termais oceânicas
		Bactéria não cultivável	99	98	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	98	HQ379140	Crosta oceânica
H03	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	GQ850554	Água marinha
		<i>Acinetobacter junii</i>	99	99	AY881242	Água marinha
E04	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	EU394575	Água marinha
B11	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
E09	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	JN314436	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	DQ857749	Coral <i>Cirripathes lutkeni</i>
H01	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	Bactéria não cultivável	99	100	EF572540	Água marinha
A03	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	FN824032	<i>Artemia</i> spp.
H08	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	HQ379140	Crosta oceânica
C02	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	100	FJ825890	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	100	HM243651	Eponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	100	JF344342	Sedimento marinho
H02	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	99	AM402950	Sedimento marinho
H04	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	99	AM402950	Sedimento marinho
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	EU780304	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
C06	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
B08	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	100	FJ826007	Água marinha

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
A06	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243654	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ826007	Água marinha
A07	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Enhydrobacter</i>	Moraxella sp.	99	99	FJ943497	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	99	AB176225	Água do mar profundo
B09	Gammaproteobacteria: Alteromonadaceae: <i>Haliea</i>	Gammaproteobacteria	99	99	AB602427	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	99	GU583975	Solo de manguezal
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ203223	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ717226	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	AJ633945	Cephalopoda dos gêneros <i>Loligo</i> , <i>Photololigo</i> , <i>Sepioteuthis</i> e <i>Loliolus</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	GU451531	Macroalgas
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	95	GQ350852	Banquias de bivalves de zona oceânica profunda
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	95	DQ889883	Octocoral <i>Erythropodium caribaeorum</i>
		<i>Haliea</i> sp.	99	95	GU124598	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	95	GU119423	Várias espécies de Corais do caribe
A04	Bacteroidetes: Saprosiraceae	Bacteroidetes não cultivável			AM238598	Água do mar
		Bactéria não cultivável	99	95	EU627947	Água de piscicultura e corais <i>Porites</i> sp. e <i>Agaricia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	95	JN230230	Sedimento marinho
		Bacteroidetes não cultivável	99	95	EU315651	Esponjas, ascidia, e água do mar
		Bacteroidetes não cultivável	99	95	EU246796	Coral <i>Pocillopora</i> sp.
		Bacteroidetes não cultivável	99	95	AM040132	Sedimento marinho

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
D12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	FN824032	<i>Artemia</i> sp.
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	100	GU061292	Água marinha
G04	Alphaproteobacteria: Hyphomonadaceae: <i>Ponticaulis</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	EF123311	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Hyphomonas</i> sp.	99	94	FJ425626	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Flavobactéria não cultivável	99	94	EU780404	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Bactéria não cultivável	99	93	GU118388	Várias espécies de corais do caribe
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	93	DQ269090	Esponja <i>Cymbastela concentrica</i>
		Bactéria não cultivável	99	93	JN639310	Decápoda <i>Nephrops norvegicus</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	93	HQ241770	Esponja <i>Tsitsikamma</i> sp.
		<i>Hyphomonas jannaschiana</i>	99	93	DQ659446	Sedimento marinho profundo
		<i>Hyphomonas</i> sp.	99	93	AY690715	Solo de estuário
H06	Cyanobacteria: Bacillariophyta	Cyanobacteria não cultivável	99	93	EU780335	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Cyanobacteria não cultivável	99	93	GU119685	Várias espécies de corais do caribe
		Bactéria não cultivável	99	93	EU290306	Esponja <i>Tethya californiana</i>
		Bactéria não cultivável	99	93	FJ930841	Corais <i>Porites compressa</i> e <i>Porites lobata</i>
		Eucarionte fototrófico não cultivável	99	93	JF835767	Coral <i>Siderastrea stellata</i>
		Cyanobacteria não cultivável	99	93	FJ425619	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Cyanobacteria não cultivável	99	93	EU780332	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Bactéria não cultivável	99	93	EU346643	Esponja <i>Haliclona sp.</i>
G01	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	93	HQ677218	Bivalve <i>Argopecten purpuratus</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	93	AY770721	Ascidia <i>Microcosmus</i> sp.

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
G05	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
G03	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ825911	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	99	JN230103	Sedimento marinho
F03	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HQ588502	Sedimento marinho profundo
E11	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	AY588958	Sedimento marinho profundo
D10	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	JN314436	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	100	HQ379140	Crosta oceânica
F05	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	Bactéria não cultivável	99	100	GU189010	Crosta oceanica
		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	100	FM992758	Água marinha
H05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	99	GU119426	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	HQ270275	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>Xestospongia testudinaria</i>
		Rhodobacteraceae	99	99	EF629844	Esponja <i>Mycale laxissima</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	98	99	JN210841	Larvas da Esponja <i>Rhopaloeides odorabile</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203135	coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	DQ117434	Coral <i>Fungia granulosa</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	EF123421	<i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	98	99	AF098493	Água marinha
		Bactéria não cultivável	98	99	FJ952692	Coral <i>Montastrea annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	EU780331	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
E12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	HQ379140	Crosta oceanica
D11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	76	97	HM177750	Biofilme de alga coralina
		Bactéria não cultivável	76	97	FR851740	Sedimento marinho
		<i>Ruegeria</i> sp.	76	97	HQ439525	Larvas de <i>Pocillopora damicornis</i>
		<i>Loktanella koreensis</i>	76	97	NR_043741	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	76	97	FJ937716	Sedimento de estuário
		Rhodobacteraceae não cultivável	76	97	AB470943	Coral <i>Montipora</i> sp.
		Bactéria não cultivável	76	96	AY654808	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	76	96	FJ952683	Coral <i>Montastrea annularis</i>
		<i>Loktanella tamlensis</i>	76	96	DQ533556	Água marinha
		G08	Bacteroidetes: Flavobacteriaceae	Bactéria não cultivável	99	92
Flavobactéria não cultivável	99			91	AB602429	Água marinha
Bactéria não cultivável	100			91	FJ809333	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
Bactéria não cultivável	99			91	FJ203426	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
Bactéria não cultivável	99			91	JN639314	Decapoda <i>Nephrops norvegicus</i>
Flavobacteriaceae não cultivável	98			91	EF092235	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
Bactéria não cultivável	92			93	GU185133	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
Bactéria não cultivável	99			91	EU491731	Crosta oceânica
Bactéria não cultivável	99			91	DQ416582	Coral <i>Oculina patagonica</i>
Bactéria não cultivável	97			91	EU290370	Esponja <i>Tethya californiana</i>

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
B04	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	99	JF925027	Corais
A08	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	HQ379140	Crosta oceânica
B05	Gammaproteobacteria: Enterobactériaceae: <i>Enterobacter</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	100	EU590682	Solo de estuário
D02	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
E10	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	Bactéria não cultivável	99	99	GU189010	Crosta oceânica
		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	99	FM992745	Água marinha
		Bactéria não cultivável	97	99	FR851740	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	96	FJ952683	Coral <i>Montastrea annularis</i>
D01	Rhodobacterales: Rhodobacteraceae	<i>Jannaschia helgoleensis</i>	99	96	AJ534224	Água marinha, diatomáceas e dinoflagelados cultivados
		<i>Jannaschia helgoleensis</i>	99	96	NR_028976	Água marinha
		<i>Loktanella</i> sp.	99	95	FJ753162	Polychaeta <i>Nereis Diversicolor</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	AY654808	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Rhodobacteraceae bacterium	99	95	FJ403088	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	95	FN582318	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
E02	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	95	HQ443388	Água marinha
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	95	HQ379140	Crosta oceânica
		Bactéria não cultivável	99	95	EU181965	Sedimento marinho e água marinha

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
G11	Gammaproteobacteria: Halomonadaceae	<i>Halomonas cerina</i>	99	95	NR_044316	Água marinha
		<i>Halomonas</i> sp.	99	95	EU249967	Coral <i>Pocillopora meandrina</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	FJ717197	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Bactéria não cultivável	99	88	FJ716888	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Alphaproteobacterium	99	88	AB377222	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	89	FJ202650	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	88	EU287341	Sedimento marinho
D04	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria	99	88	AB571945	Larvas de <i>Acropora</i>
		Bactéria não cultivável	99	88	AB476180	Caranguejo <i>Shinkaia crosnieri</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	88	DQ860071	Ascídia <i>Cystodytes dellechiaiei</i>
		Bactéria não cultivável	99	88	FJ202090	coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	88	AY942776	Esponja <i>Cymbastela concentrica</i>
		<i>Kordiimonas</i> sp.	95	88	DQ917831	Coral <i>Muricea elongata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	87	JN106649	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
		<i>Kordiimonas</i> sp.	99	87	EF092170	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
		Bactéria não cultivável	97	88	HE574869	Lula <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	87	EU236400	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	87	FJ202379	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
B07	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
A05	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	EF574595	Água marinha
		Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ825890	Água marinha
	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
H09	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	HQ379140	Crosta oceânica
		Bactéria não cultivável	97	98	FR851482	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ203299	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
E03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	AJ633989	Cephalopodds gêneros <i>Loligo</i> , <i>Photololigo</i> , <i>Sepioteuthis</i> e <i>Loliolus</i>)
		Bactéria não cultivável	97	98	FJ999598	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ200591	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Alphaproteobacteria	97	97	AB302378	Água marinha
		<i>Pseudoruegeria</i> sp.	98	97	EU246829	Corais <i>Porites compressa</i> e <i>Porites lobata</i>
		<i>Pseudoruegeria</i> sp.	97	97	FJ752798	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
		Bactéria não cultivável	99	96	FJ716876	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	EF123331	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Tateyamaria</i> sp.	98	96	EF657871	Octocoral <i>Eunicea fusca</i>
		Bactéria não cultivável	97	97	JF827547	Bivalve <i>Crassostrea gigas</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	AY654835	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria marinha	99	97	HM100760	Esponja <i>Hymeniacidon flavia</i>
		B06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Loktanella</i>	<i>Ruegeria</i> sp.	99	97
Rhodobacteraceae não cultivável	99			97	FJ403075	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
Alphaproteobacteria não cultivável	99			97	AM930449	Echinoidea <i>Tripneustes gratilla</i>
G06	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	97	AM402950	Sedimento marinho profundo
C03	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	99	97	GQ850554	Água marinha

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
D09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Nautella</i>	Bactéria não cultivável	99	100	DQ985905	Larvas de Lagosta
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ202114	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123387	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	97	100	EF414227	Esponja <i>Clathria prolifera</i>
		<i>Nautella italica</i>	93	99	JN615464	alga, ascídias e Esponjas
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	97	HM593558	Esponja <i>Terpios hoshinota</i> e corais cobertos por ela
		Bactéria não cultivável	99	97	HM768674	<i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ446102	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
G10	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	JN314436	Água marinha
C11	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ825890	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	99	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
C10	Gammaproteobacteria: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	99	AM402950	Sedimento marinho
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	99	EU780304	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
B10	DeltaProteobacteria: Polyangiaceae: <i>Byssovorax</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	86	AM997367	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	86	EU488075	Bivalves <i>Luciniscia nassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>
		DeltaProteobacteria não cultivável	99	86	DQ200431	Coral <i>Montastraea annularis</i>
A09	Gammaproteobacteria: Legionellaceae: <i>Legionella</i>	<i>Legionellales</i> sp.	99	94	FJ517674	<i>Hydra magnipapillata</i>
		<i>Legionellales</i> sp.	99	94	EF667907	<i>Hydra oligactis</i> e <i>Hydra vulgaris</i>
G12	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	94	HQ270240	Esponjas

Tabela A: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. caribaeorum*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). Conclusão.

UTO	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
F07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	FJ809419	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Rhodobacteraceae bacterium	99	98	AB470950	Coral <i>Montipora</i> sp.
		<i>Shimia</i> sp.	99	98	FJ976449	Coral <i>Isopora palifera</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	GQ204845	coral <i>Montipora hispida</i>
		<i>Shimia</i> sp.	99	98	JN210861	Larvas da Esponja <i>Rhopaloeides odorabile</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ202986	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		bacterium S1cc38	99	98	DQ416585	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	HM768402	<i>Gorgonia ventalina</i>
B01	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	98	HM243635	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
B02	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	98	HQ270240	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>Xestospongia testudinaria</i>
D07	Gammaproteobacteria: Moraxellaceae: <i>Acinetobacter</i>	Bactéria não cultivável	99	100	HM243651	Esponjas <i>Clathria rugosa</i> e <i>Clathria vulpina</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	99	FJ826007	Água marinha

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continua.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
B09	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria não cultivável	99	82	AY589474	Água marinha
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	82	HQ673542	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	82	EU491119	Crosta oceânica
		Bactéria não cultivável	99	82	GQ391976	Octocoral <i>Pseudopterogorgia americana</i>
		Bactéria não cultivável	99	82	EU805401	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	82	EU491680	Crosta oceânica
H09	Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	91	EU005323	Água e sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	91	GU118141	várias espécies de corais do caribe e água do mar
		Bactéria não cultivável	98	90	GQ215213	Coral <i>Favia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	90	EU491552	Crosta oceânica
		Bactéria não cultivável	98	90	FJ716882	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Bactéria não cultivável	99	90	HM768706	<i>Gorgonia ventalina</i>
H03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	95	AM085464	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	100	94	FJ202842	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Rhodobacteraceae ACEMC 6-10	99	94	FM163091	Bacterioplâncton
		Bactéria marinha não cultivável	100	94	GU319262	Coral <i>Acropora eurystoma</i>
		Alphaproteobacteria C54	99	94	AB302371	Água marinha
		<i>Rhodobacter maris</i>	99	94	NR_042629	Água marinha
H04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Oceanicola</i>	Bactéria não cultivável	99	98	FR851545	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	DQ200607	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ999598	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ203299	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	97	HM593522	Esponjas e corais
		Bactéria não cultivável	99	97	JF835679	Coral <i>Siderastrea stellata</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
		Bactéria não cultivável	99	97	HM768378	Coral <i>Gorgonia ventalina</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	GU118853	Várias espécies de corais do caribe e água do mar
		Bactéria não cultivável	99	97	GU200277	Coral <i>Mussismilia hispida</i>
		Bactéria não cultivável	99	96	FJ202840	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	EU780301	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Bactéria não cultivável	99	96	HM768500	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		Bactéria não cultivável	91	97	GU185023	Corais <i>Pocillopora damicornis</i> , <i>Acropora tenuis</i> e <i>Favites abdita</i>
H05	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria	99	91	AB571945	Larvas do Coral <i>Acropora</i> sp.
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	90	EF092208	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
		Bactéria não cultivável	99	90	FJ716888	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Bactéria não cultivável	99	90	EU287341	Sedimento marinho
		<i>Thalassospira</i> sp. 2ta2	99	90	FJ952806	<i>Montastrea annularis</i>
		Bactéria não cultivável	99	89	EU236400	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	89	AJ633953	Cephalopoda dos gêneros <i>Loligo</i> , <i>Photololigo</i> , <i>Sepioteuthis</i> e <i>Loliolus</i>
		Bactéria não cultivável	99	89	EU183893	Esponja <i>Rhopaloeides odorabile</i>
		Bactéria não cultivável	99	90	DQ312248	Coral <i>Alcyonium antarcticum</i>
		Bactéria não cultivável	73	97	EF206883	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Alphaproteobacteria N2yML5	99	89	EF629835	Esponja <i>Mycale laxissima</i>
		Bactéria não cultivável	97	89	FJ809395	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>A. millepora</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
G02	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	99	HM768378	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EU780301	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
G05	Tenericutes: Mollicutes: <i>Entomoplasmatales</i>	<i>Spiroplasma mirum</i>	99	92	DQ917756	Crustáceos <i>Eriocheir sinensis</i> , <i>Procambarus clarkia</i> e <i>Penaeus vannamei</i>
E05	Proteobacteria: Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	100	95	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável	100	95	FJ202840	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	100	95	HM768500	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	100	91	JN106657	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	100	91	EF206883	Coral <i>Oculina patagonica</i>
G04	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	92	88	EU803767	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ202972	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
F02	Alphaproteobacteria: Rhizobiales	Bactéria não cultivável	99	97	EU367128	Abalone <i>Haliotis diversicolor supertexta</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	GQ301244	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	GQ204829	Coral <i>Montipora hispida</i>
		Bactéria não cultivável	98	95	HM768375	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
G03	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	98	95	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	95	EU780317	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Bactéria não cultivável	100	99	EF206893	Coral <i>Oculina patagonica</i>
E09	Gammaproteobacteria	Bactéria não cultivável	100	99	EU181873	Sedimento e água marinha
		Bactéria não cultivável	100	99	EU181873	Sedimento e água marinha

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
F01	Chloroflexi: Caldilineaceae: <i>Caldilinea</i>	<i>Chloroflexi</i> não cultivável	93	93	EF630214	Esponja <i>Mycale laxissima</i>
		<i>Chloroflexi</i> não cultivável	98	91	DQ289898	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	98	91	FJ203486	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
C09	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	97	FJ202840	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável	99	95	HM768500	<i>Gorgonia ventalina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	90	98	JN106657	coral <i>Mussismilia</i> sp.
G09	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	91	EF206883	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	91	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Alphaproteobacteria	99	91	AB571945	larvas de <i>Acropora</i> sp.
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	91	JN106657	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	91	FJ716888	polychaeta <i>Arenicola marina</i>
		Bactéria não cultivável	99	91	EU287341	Sedimento marinho
F03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Thalassobius</i>	<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
		<i>Thalassobius mediterraneus</i>	99	98	AB470946	Coral <i>Montipora</i> sp.
		<i>Thalassobius</i> sp.	99	98	FJ403072	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EF123426	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EU780230	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
E03	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	DQ200437	<i>Montastraea annularis</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	GU200277	<i>Mussismilia hispida</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
G08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Roseovarius</i>	99	98	NR_041731	Bivalve <i>Crassostrea</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203129	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
D08	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	96	HM768378	<i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável			DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
F05	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	AB491819	<i>Litopenaeus vannamei</i>
			99	96		Sedimento de estuário
		Bactéria não cultivável			AM176847	Sedimento de estuário
E01	DeltaProteobacteria	Bactéria não cultivável	99	91	EU925894	Água marinha
F06	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae: <i>Silicibacter</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EU379566	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	AJ633968	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	JF411471	Água marinha
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123405	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Ruegeria</i> sp.	99	99	DQ917819	Coral <i>Muricea elongata</i>
G06	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	97	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável			FJ202663	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	HM768500	<i>Gorgonia ventalina</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável			JN106657	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
E08	Bacteroidetes		99	83	FJ203158	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bacteroidetes não cultivável			EF471540	Água marinha

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
B04	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	100	96	HM173258	Gorgônia
		Bactéria não cultivável	100	96	GU200029	Coral <i>Mussismilia hispida</i>
		Bactéria não cultivável	100	96	GU185115	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
B03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
		<i>Maritimibacter</i> sp.	99	98	EU440991	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	98	EU883374	Esponjas <i>Halichondria</i> sp., <i>Haliclona</i> sp., e <i>Xestospongia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203019	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
B07	Gammaproteobacteria: <i>Arenicella</i>	Bactéria não cultivável	99	98	FJ425593	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	98	GQ204883	Coral <i>Montipora hispida</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	EU236293	<i>Haliclona</i> sp.
		<i>Arenicella xantha</i>	99	98	AB500096	Sedimento marinho
B06	Bacteroidetes: Flavobacteriaceae	Bactéria não cultivável	99	94	GQ301393	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	99	94	EF573475	Água marinha
		Flavobactéria não cultivável	99	94	AM279185	Água marinha
C04	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	96	HM768378	<i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável			DQ200437	<i>Montastraea annularis</i>
D10	Alphaproteobacteria	Gammaproteobacteria não cultivável	99	98	JN106657	coral <i>Mussismilia</i> sp.
		Bactéria não cultivável			GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
C03	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	96	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Gammaproteobacteria não cultivável			JN106657	coral <i>Mussismilia</i> sp.
A09	Chloroflexi: Caldilineaceae: <i>Caldilinea</i>	Bactéria não cultivável	99	93	FJ203486	Coral <i>M. faveolata</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
C05	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	93	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável	99	92	FJ202967	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria			AB571945	larvas de <i>Acropora</i> sp.
D05	Firmicutes	Bactéria não cultivável	99	86	AM911366	Coral <i>Lophelia pertusa</i>
		Bactéria não cultivável	94	87	HQ189552	Anêmona-do-mar <i>Nematostella vectensis</i>
		<i>Spiroplasma melliferum</i>	95	86	NR_025756	Camarão <i>Penaeus vannamei</i>
D04	Alphaproteobacteria	Myxococcales não cultivável	99	97	FJ418101	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	98	HM768378	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
E12	DeltaProteobacteria	Bactéria não cultivável	98	89	FM165238	Polychaeta vertimentifero
E10	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	92	FJ202840	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria			AB571945	larvas do Coral <i>Acropora</i> sp.
		Bactéria não cultivável			HM768500	<i>Gorgonia ventalina</i>
D11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	FJ215361	pesquisar!!!
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
		<i>Thalassobius mediterraneus</i>	99	98	AB470946	Coral <i>Montipora</i> sp.
		<i>Thalassobius</i> sp.	99	98	FJ403072	Coral <i>Montastre faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EF123432	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
D12	Actinobacteria:lamiaceae: <i>lamia</i>	Bactéria não cultivável	99	98	EU236409	<i>Haliclona</i> sp.
		Bactéria não cultivável			GU061677	Água marinha
D01	Bacteroidetes	Bacteroidetes não cultivável	99	93	AM040120	Sedimento marinho

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
F12	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	98	FJ203030	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	ascidia <i>Halocynthia roretzi</i>
		<i>Maritimibacter</i> sp.	99	98	EU440991	Água marinha profunda
F07	Gammaproteobacteria	Bactéria marinha não cultivável	99	99	HQ241809	Esponja <i>Tsitsikamma</i> sp.
F11	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	95	FJ041400	Coral <i>Lophelia pertusa</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	EU780301	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	GU200277	Coral <i>Mussismilia hispida</i>
D03	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Bactéria não cultivável			HM768373	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
B02	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	100	95	EF206883	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável			JN106657	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
G12	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae: <i>Thalassobius</i>	<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
		<i>Thalassobius mediterraneus</i>	99	98	AB470946	Coral <i>Montipora</i> sp.
D02	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	92	95	FJ202090	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
B01	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria não cultivável	92	95	GU230310	Água marinha
G11	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
D06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	ascidia <i>Halocynthia roretzi</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	EU883374	Sedimento marinho
		<i>Roseovarius pacificus</i>	99	98	NR_043564	Sedimento marinho
D07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	99	EF207073	Coral <i>Oculina patagonica</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
H02	Tenericutes: Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i> sp.	99	92	DQ917755	Crustaceos <i>Eriocheir sinensis</i> , <i>Procambarus clarkia</i> e <i>Penaeus vannamei</i>
B10	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	97	HM768374	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ200475	Coral <i>Montastraea annularis</i>
C10	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae: <i>Loktanella</i>	<i>Loktanella</i> sp.	99	97	JN885197	Água marinha
		<i>Ruegeria</i> sp.	99	97	HQ439525	Larvas de <i>Pocillopora damicornis</i>
		<i>Loktanella koreensis</i>	99	97	NR_043741	Sedimento marinho
A11	DeltaProteobacteria	Bactéria não cultivável	84	97	GU185595	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
H10	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	DQ200437	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Bactéria não cultivável	99	96	HM768378	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
C02	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	97	FJ202840	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
A12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Silicibacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	FJ809415	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EU379566	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123300	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	100	99	DQ416551	Coral <i>Oculina patagonica</i>
H12	Gammaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	84	FJ717258	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
C12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	96	FJ748819	sedimento de estuário
		Bactéria não cultivável	99	96	FJ809317	Corais <i>M. aequituberculata</i> e <i>A. millepora</i>

Tabela B: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *Z. sociatus*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Conclusão.*

Uto	RDP	NCBI	Con	ID	Acesso	Origem
A01	Bacteroidetes	Bactéria não cultivável	99	99	GU981831	Esponja <i>Astrosclera willeyana</i>
		Bacteroidetes não cultivável			FJ529361	Esponja <i>Svenzea zeai</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ930875	Corais <i>Porites compressa</i> e <i>Porites lobata</i>
		Bacteroidetes não cultivável	99	99	EU861204	Coral <i>Acropora palmata</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	EU283150	Água marinha
A08	Gammaproteobacteria: Ferrimonadaceae: <i>Ferrimonas</i>	Bactéria não cultivável	99	98	EF207102	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	98	DQ446112	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
C08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	97	GQ301468	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	97	FJ403109	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	EU236334	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Alphaproteobacteria	99	97	AB302380	Água marinha
		Alphaproteobacteria	99	96	AF034934	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	HM057760	Água marinha
F10	Alphaproteobacteria : Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	98	FJ203019	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	HQ852039	Ascídia <i>Halocynthia roretzi</i>
B12	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	96	HM768376	<i>Gorgonia ventalina</i>
B11	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	96	GU185023	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	96	JN106657	Coral <i>Mussismilia</i> sp.

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continua.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
G02	Bacteroidetes:	Bacteroidetes não cultivável	94	93	DQ289924	Sedimento marinho
	Rhodothermacea: <i>Salisaeta</i>	Bactéria não cultivável	98	90	FJ930703	Corais <i>Porites compressa</i> e <i>Porites lobata</i>
		Bacteroidetes não cultivável	99	90	GQ350473	Branquias de bivalves de zona oceânica profunda
		<i>Sphingobacterim</i> sp.	99	89	FJ745114	Água marinha
		Bactéria não cultivável	88	99	GU118579	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		<i>Cytophaga</i> sp.	88	99	DQ889917	Octocoral <i>Erythropodium caribaeorum</i>
		Sphingobactériaes Não cultivável	89	92	EF092187	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
		Bactéria não cultivável	88	99	FJ900520	Esponjas <i>Ancorina alata</i> e <i>Polymastia</i> sp
		Bactéria não cultivável	91	83	GU185752	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável	89	92	FM160866	Esponja <i>Aplysina fulva</i>
		Bactéria não cultivável	89	91	FJ809049	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
G01	Cyanobacteria:VIII:GPVIII	<i>Acaryochloris</i> sp.	99	99	DQ917811	Coral <i>Muricea elongata</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	GU118090	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Cyanobacteria não cultivável	96	99	AY701298	Esponjas <i>Aplysina aerophoba</i> e <i>Theonella Swinhoei</i>
		<i>Candidatus Acaryochloris bahamiensis</i>	96	98	JF506209	Ascidias <i>Trididemnum</i> spp. e <i>Lisoclinum</i> spp.
		<i>Acaryochloris marina</i>	95	99	AB058298	Cultura de cianobactérias marinhas
		Bactéria não cultivável	95	99	GQ412920	Água de piscicultura

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
D10	Alphaproteobacteria:Hyphomicrobiales:Filomicrobium	Bactéria não cultivável	99	99	FJ203378	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	DQ431901	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	DQ860065	Ascidia <i>Cystodytes dellechiaiei</i>
		Bactéria não cultivável	98	98	EF395606	Água marinha
		Bactéria marinha não cultivável	99	98	GU319318	Coral <i>Acropora eurystoma</i>
		Bactéria marinha não cultivável	98	98	FJ999608	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Bactéria não cultivável	98	98	GQ301490	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	DQ200503	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Bactéria marinha não cultivável	98	98	GU319294	Coral <i>Acropora eurystoma</i>
		Bactéria não cultivável	97	97	EU488049	Bivalves <i>Luciniscanassula</i> and <i>Phacoides pectinatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	98	EU246798	Coral <i>Pocillopora Meandrina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	94	EF414108	Esponja <i>Clathria prolifera</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	95	FJ752951	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
		Bactéria não cultivável	98	90	GU185598	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		D03	Cyanobacteria: VIII:GPVIII	Alphaproteobacteria não cultivável	98	88
Bactéria não cultivável	94			99	JF827394	Bivalve <i>Crassostrea gigas</i>
Bactéria não cultivável	99			96	FJ203411	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	96	DQ269125	Esponja
		Bactéria não cultivável	99	96	GQ412897	Água de piscicultura

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
E01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	99	FJ809542	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	GQ204820	Coral <i>Montipora Hispida</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	DQ416652	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	GU185271	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	99	EU742628	Água marinha
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	DQ446155	Coral <i>Siderastrea Siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	AY845242	Esponjas
		Bactéria não cultivável	99	99	EU883374	Esponjas <i>Halichondria</i> sp., <i>Haliclona</i> sp., e <i>Xestospongia</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ489736	Juvenis de <i>Acropora tenuis</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	99	99	EF092221	Esponja <i>Axinella corrugate</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	99	95	FJ425615	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	EU488042	Bivalves <i>Lucinisca nassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	EU491439	Crosta oceânica
		D08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Ruegeria</i>	Bactéria não cultivável	99	99
Bactéria não cultivável	99			99	HE574880	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
Bactéria não cultivável	99			99	HM768674	<i>Gorgonia ventalina</i>
Alphaproteobacteria não cultivável	99			99	DQ446102	Coral <i>Siderastrea Sidereal</i>
Alphaproteobacteria não cultivável	99			99	GQ204861	Coral <i>Montipora Hispida</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
E05	Actinobacteria: Acidimicrobidae	Acidimicrobidae não cultivável	99	94	JN596601	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>Xestospongia</i> <i>testudinaria</i>
H08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	98	AY654831	Octocoral <i>Oculina</i> <i>patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	AY845242	Esponjas <i>Lamellodysidea</i> <i>herbacea</i> , <i>Lamellodysidea</i> <i>chlorea</i> , <i>Lendenfeldia</i> <i>chondrodes</i> e <i>Phyllospongia</i> <i>papyracea</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EF123383	Coral <i>Siderastrea</i> <i>siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ809542	Corais <i>Montipora</i> <i>aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203288	Coral <i>Montastraea</i> <i>faveolata</i>
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	98	FJ999566	Esponja <i>Haliclona</i> <i>simulans</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	99	98	EF092221	Esponja <i>Axinella</i> <i>corrugata</i>
		<i>Roseovarius aestuarii</i>	99	98	FM180527	Esponja <i>Tedania anhelans</i>
		Rhodobacterales não cultivável	99	98	HM798703	Água marinha profunda
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	GQ204820	Coral <i>Montipora</i> <i>hispida</i>
	Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EU246804	Coral <i>Pocillopora</i> <i>Meandrina</i>	
G09	Bacteroidetes: Flavobacteriaceae	Bactéria não cultivável	99	98	FJ202198	Coral <i>Montastraea</i> <i>faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	HQ588489	Sedimento marinho
B10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	97	FJ809236	Corais <i>Montipora</i> <i>aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Alphaproteobacteria	99	97	AB330821	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ203317	Coral <i>Montastraea</i> <i>faveolata</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
B11	Gammaproteobacteria: Ectothiorhodospiraceae: <i>Ectothiorhodosinus</i>	Bactéria não cultivável	98	89	AM911352	Coral
		Bactéria não cultivável	88	98	GU567160	<i>Lophelia pertusa</i> Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	88	98	JN113080	Esponja <i>Astrosclera willeyana</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	87	98	DQ200514	Coral <i>Montastraea annularis</i>
H09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Donghicola</i>	Bactéria não cultivável	87	98	FJ202842	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	87	98	HE574912	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	87	98	GQ204809	Coral <i>Montipora hispida</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	FJ752925	Polychaeta <i>Nereis Diversicolor</i>
A12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	95	AY654839	Octocoral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	EU183950	Larvas da esponja <i>Rhopaloeides odorabile</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	JN694832	Coral <i>Porites astreoides</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	EF123383	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	HE574923	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	HM768360	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
		<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM	95	95	NR_028728	Sedimento marinho
B03	Gammaproteobacteria: Coxiellaceae: <i>Aquicella</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	99	92	DQ431905	Sedimento marinho
D12	Bacteroidetes: Flammeovirgaceae: <i>Roseivirga</i>	Flexibacteraceae não cultivável	99	92	FJ403089	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	92	AY654823	Octocoral <i>Oculina patagonica</i>
		Bacteroidetes não cultivável	99	92	JN106597	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
D11	Bacteroidetes	Bacteroidetes não cultivável	99	97	AM040120	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	97	96	EU290317	Esponja <i>Tethya californiana</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
G08	Firmicutes:Clostridiaceae: <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> sp.	99	91	AB470963	Coral <i>Montipora</i> sp.
		<i>Clostridium</i> sp.	99	91	EF092243	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
		Bactéria não cultivável	99	91	EU236399	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	91	GU982762	Sedimento marinho
B04	Gammaproteobacteria	Bactéria do mar profundo não cultivável	99	99	AM997897	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	98	99	JF827550	Bivalve <i>Crassostrea gigas</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	JF835645	Coral <i>Siderastrea stellata</i>
		Bactéria marinha não cultivável	98		HQ241792	Esponja <i>Tsitsikamma</i> sp.
A07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	FJ809321	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	GQ301294	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	EU488073	Bivalves <i>Luciniscia nassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>
		Bactéria não cultivável	96	99	DQ256654	Sedimento marinho
		Rhodobacteraceae não cultivável	96	99	EU302871	Esponja <i>Topsentia nigrocutis</i>
G06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	95	FJ202122	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	GQ204825	Coral <i>Montipora hispida</i>
		Bactéria não cultivável	99	95	EU236395	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	DQ811852	Sedimento de estuário
C07	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	93	92	GQ163757	Esponjas <i>Hyrtios erectus</i> e <i>Amphimedon</i> sp.
		Bactéria não cultivável	99	90	EU491704	Crosta oceânica
G11	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria não cultivável	98	95	FJ425615	Coral <i>Montastrea Faveolata</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
G10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Oceanicola</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	GQ204809	Coral <i>Montipora hispida</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	FN582322	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	DQ200416	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	95	FJ752925	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
C06	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.	99	98	DQ275599	Água doce
G03	Bacteroidetes: Flavobacteriaceae: <i>Actibacter</i>	Bactéria não cultivável	99	98	DQ416621	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bacteroidetes não cultivável	99	98	GQ249488	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	97	98	EF125443	Solo de estuário
		Bacteroidetes não cultivável	97	98	JN662233	Polychaeta <i>Ridgeia piscesae</i>
C05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	98	98	DQ256654	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	98	DQ200539	Coral <i>Montastraea Annularis</i>
		Bactéria não cultivável	98	98	FJ203480	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ638616	Ascidia <i>Halocynthia roretzi</i>
		Alphaproteobacteria	97	99	AB330821	Água marinha
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ716872	Polychaeta <i>Arenicola marina</i>
G04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	97	FJ809321	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Proteobacteria não cultivável	99	97	GU056905	Solo de estuário
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ638616	Ascidia <i>Halocynthia roretzi</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	FJ912455	Estromatólitos
D04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	97	FR851493	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ203299	Coral <i>Montastraea faveolata</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
A09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	FJ809321	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	DQ256654	Sedimento marinho
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	96	EU302871	Esponja <i>Topsentia nigrocutis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	EF123404	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
E09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Oceanicola</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	AJ633990	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	FR851498	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	98	97	FJ930391	Corais <i>Porites compressa</i> e <i>Porites lobata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	FJ752925	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
G05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	FJ752925	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ200607	Coral <i>Montastraea annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	FN582322	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ289933	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	97	GU185225	Coral <i>Pocillopora damicornis</i> e água marinha
		Bactéria não cultivável	99	97	JF835679	Coral <i>Siderastrea stellata</i>
D05	Gammaproteobacteria : Alteromonadaceae: <i>Haliea</i>	Bactéria não cultivável	99	95	FJ545459	Sedimento marinho
		Bactéria marinha não cultivável	98	98	GU319231	Coral <i>Acropora eurystoma</i>
		Bactéria não cultivável	94	99	FJ425636	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Gammaproteobacteria	94	99	FJ999568	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
E07	Alphaproteobacteria; Sphingomonadaceae	Bactéria marinha não cultivável	99	94	HM100777	Esponja <i>Hymeniacidon flavia</i>
		Bactéria não cultivável	99	94	FJ809148	Coral <i>Acropora millepora</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
E06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Silicibacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	FJ952681	Coral <i>Montastrea annularis</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ203405	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria	99	99	DQ107389	Coral <i>Fungia scutaria</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	AM930446	Echinoidea <i>Tripneustes gratilla</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	GQ301324	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	FJ403081	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
C01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	FJ752925	Polychaeta <i>Nereis diversicolor</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ200606	Coral <i>Montastraea Annularis</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	AJ633990	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	FN582322	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	DQ289933	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	97	JF835679	Coral <i>Siderastrea stellata</i>
G12	Alphaproteobacteria: Hyphomicrobiaceae	Bactéria não cultivável	99	98	EU491581	Crosta oceânica
		Bactéria não cultivável	96	99	EF125408	Sedimento de estuário
		Bactéria não cultivável	96	99	EU488049	Bivalves <i>Luciniscanassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	EU246798	Coral <i>Pocillopora meandrina</i>
F10	Acidobactéria	Bactéria não cultivável	99	97	EU287102	Sedimento marinho
C02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	FR851498	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123331	Coral <i>Siderastrea sidereal</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	AJ633990	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
H12	Actinobacteria:lamiaceae: <i>lamia</i>	Bactéria não cultivável	99	96	AM911370	Coral <i>Lophelia pertusa</i>
		<i>Acidimicrobidaebacterium</i>	99	96	JN596724	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>Xestospongia testudinaria</i>
		Actinobacteria não cultivável	99	96	FJ529275	Esponja <i>Svenzea zeai</i>
C11	Alphaproteobacteria: Hyphomicrobiaceae: <i>Filomicrobium</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	DQ431901	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EU350911	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	DQ860065	Ascidia <i>Cystodytes dellechiaiei</i>
		Bactéria não cultivável	98	99	FJ203575	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	94	EF414108	Esponja <i>Clathria prolifera</i>
		Bactéria marinha não cultivável	98	98	GU319318	coral <i>Acropora eurystoma</i>
H11	Betaproteobacteria: Burkholderiaceae: <i>Cupriavidus</i>	Bactéria não cultivável	99	99	EU236274	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
C10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	98	98	EF123383	Coral <i>Siderastrea sidereal</i>
		Mucus bacterium	99	99	AY654831	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	98	EU246804	Coral <i>Pocillopora meandrina</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	AY845242	Esponjas
A04	Alphaproteobacteria: Hyphomicrobiaceae: <i>Filomicrobium</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	EU350911	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	DQ431901	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	94	99	EF414108	Esponja <i>Clathria prolifera</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	DQ860065	Ascidia <i>Cystodytes dellechiaiei</i>
		Bactéria não cultivável	98	99	EF125408	Solo de estuário
		Bactéria não cultivável	99	97	EU488049	Bivalves <i>Luciniscia nassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
E11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	GU170797	Água marinha
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	99	GQ204857	Coral <i>Montipora Hispida</i>
		Gammaproteobacteria não cultivável	98	99	JN106655	Coral <i>Mussismilia</i> sp.
		Alphaproteobacteria	98	99	AB302367	Água marinha
A03	Gammaproteobacteria: Alteromonadaceae: <i>Halieta</i>	Gammaproteobacteria não cultivável	98	99	GQ452899	Água marinha
		Bactéria não cultivável	98	99	GU583975	Sedimento de estuário
E12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	GQ301271	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FR851683	Sedimento marinho
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	EF123331	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ999598	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	AJ633990	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ809237	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
A02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	99	FR851733	Sedimento marinho
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ203275	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	FJ999598	Esponja <i>Haliclona simulans</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	EU780367	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
A01	Cyanobacteria	<i>Acaryochloris</i> sp.	91	94	DQ917811	Coral <i>Muricea Elongata</i>
		Bactéria não cultivável	94	94	DQ256642	Sedimento marinho
		Cyanobacteria não cultivável	94	94	AY701298	Esponjas <i>Aplysina aerophoba</i> e <i>Theonella swinhoei</i>
		<i>Candidatus Acaryochloris bahamiensis</i>	89	94	JF506202	Ascidias <i>Ascidias Trididemnum</i> spp. e <i>Lisoclinum</i> spp.

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
F12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	89	94	AY654839	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	89	94	JN694832	Coral <i>Porites astreoides</i>
		Bactéria não cultivável	89	94	HE574880	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	89	94	EU183950	Esponja <i>Rhopaloeides odorabile</i>
		Bactéria não cultivável	89	94	FJ202353	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	89	94	EF123384	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	HM768360	Gorgônia <i>Gorgonia ventalina</i>
E10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EF123331	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	AJ633989	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	EU488073	Bivalves <i>Lucinisca nassula</i> e <i>Phacoides pectinatus</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	FJ809235	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
		Bactéria não cultivável	99	97	DQ256624	Sedimento marinho
		Alphaproteobacterium	97	99	NR_041598	Água marinha
		Bactéria não cultivável	97	99	GU174648	Coral <i>Acropora tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	97	99	GQ301455	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
A06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	DQ416574	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		<i>Phaeobacter</i> sp.	99	98	HM545911	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	98	HE574911	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	EF123384	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	HM593567	Esponja <i>Terpios hoshinota</i>
B08	<i>TM7_genera_incertainae_sedis</i>	TM7 não cultivável	99	98	JN596599	Esponjas

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
A05	Cyanobacteria	<i>Acaryochloris</i> sp. Não cultivável	93	95	FJ216171	Coral <i>Siderastrea stellata</i>
		<i>Acaryochloris</i> sp.	98	91	DQ917811	Coral <i>Muricea elongata</i>
F11	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	95	99	EF206845	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	94	GQ301502	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	96	99	FJ203466	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	96	99	EU236327	Esponja <i>Tethya californiana</i>
		Bactéria não cultivável	96	99	AY942756	Esponja <i>Cymbastela concentrica</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	93	FJ425641	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
C03	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria não cultivável	99	93	EF629610	Esponja <i>Ircinia Strobilina</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	93	DQ289935	Sedimento marinho
C04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123383	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	FJ203288	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	AY654831	Coral <i>Oculina Patagonica</i>
F05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	96	GQ301319	Juvenis de <i>Acropora millepora</i> e <i>A. tenuis</i>
		Bactéria não cultivável	100	98	FJ809237	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
F04	Cyanobacteria	Cyanobacteria	99	98	AB546731	Dinoflagelado <i>Epithemia sorex</i>
		<i>Rhopalodia gibba</i>	99	98	AJ582391	Dinoflagelado <i>Rhopalodia gibba</i>
		Cyanobacteria	100	97	DQ289927	Sedimento marinho
H07	Alphaproteobacteria	Bactéria não cultivável	100	97	FJ202967	Coral <i>Montastraea faveolata</i>

Tabela C: Afiliação filogenética das UTOs encontradas em *P. variabilis*, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Conclusão.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
H04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	100	97	AY654839	Coral <i>Oculina patagonica</i>
		Bactéria não cultivável	99	99	JN694832	Coral <i>Porites astreoides</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EF123383	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
H02	Gammaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	97	GU056898	Sedimento de estuário
H01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	100	98	FJ644602	Água marinha
		Bactéria não cultivável	97	98	FJ809237	Corais <i>Montipora aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
A10	Gammaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	91	EU491369	Crosta oceânica
		<i>Coxiella</i> sp. Não cultivável	97	91	EF092211	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
D01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Loktanella</i>	Marine bacterium	99	98	HM100760	Esponja <i>Hymeniacidon flavia</i>
		<i>Ruegeria</i> sp.	99	98	HQ439525	Larvas de <i>Pocillopora damicornis</i>
		<i>Loktanella</i> sp.	99	98	JN885197	Água marinha
		<i>Loktanellakoreensis</i>	99	98	NR_043741	Sedimento marinho
F09	Gammaproteobacteria	Bactéria não cultivável	99	98	EU236421	Esponja <i>Haliclona</i> sp.
C09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Silicibacter</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	EF123405	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		<i>Ruegeria</i> sp. não cultivável	99	99	DQ917819	Coral <i>Muricea elongata</i>
		Bacterium s1cb31	99	99	DQ416551	Coral <i>Oculina patagonica</i>

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continua.*

UTO	RDP	Ncbi	con	ID	Acesso	Origem
B01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057762	Água marinha
		Flavobacteriia não cultivável	99	99	AM279180	Água marinha
C04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057623	Água marinha
		<i>Roseobacter</i> sp. não cultivável	99	99	EF092182	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
D07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057810	Sedimento marinho
C07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	EF123421	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Bactéria não cultivável	99	98	FJ203135	Coral <i>Montastraea faveolata</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	98	HQ270257	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>Xestospongia testudinaria</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	98	98	FM958454	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		Bactéria não cultivável	99	100	EF574744	Água marinha
B03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	100	HM057811	Água marinha
F02	Bacteroidetes: Flavobactériaceae	Bactéria não cultivável	99	98	EF573224	Água marinha
C06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	98	EU804497	Água marinha
F07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057762	Água marinha
E08	Cyanobacteria	Bactéria não cultivável	99	99	EF575287	Água marinha
F08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	GQ245891	Água marinha

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
D08	Alphaproteobacteria: Rickettsiales: <i>Pelagibacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	EF572282	Água marinha
F05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057762	Água marinha
B06	Bacteroidetes	Bactéria não cultivável	99	99	EF572305	Água marinha
F06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Marinovum</i> sp. não cultivável	99	99	FJ745005	Água marinha
C01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Ruegeria</i> sp. não cultivável	99	100	AY712383	Salt marsh
A07	Cyanobacteria	<i>Cyanobium</i> sp.	99	93	AY172837	Água marinha
A06	Flavobactéria: Flavobacteriaceae	Flavobacteriia não cultivável	99	94	HM057688	Água marinha
A08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	94	HM057709	Água marinha
D05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	AJ633989	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
		Bactéria não cultivável	98	99	FJ203299	coral <i>Montastraea faveolata</i>
		<i>Tateyamaria omphalii</i>	96	99	NR_041255	Bivalve <i>Omphalius pfeifferi pfeifferi</i>
		Bactéria marinha	96		AJ002565	Água marinha
A09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	AplhaProteobacteria não cultivável	99	99	HM057810	Água marinha
D06	Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae	Bactéria não cultivável	99	97	FJ930437	<i>Coralis Porites compressa</i> and <i>Porites lobata</i>
		Bactéria marinha não cultivável	99	97	HM117570	Água marinha
		<i>Synechococcus</i> sp.	99	99	AY172825	Água marinha
		<i>Cianobacterium</i> sp.	99	99	JN596596	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> e <i>X. testudinaria</i>

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
C08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	<i>Pelagicola litoralis</i>	99	98	NR_044158	Água marinha
A03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Ruegeria</i> sp. não cultivável			AB294982	Águas termais oceânicas
D03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	99	97	FJ461471	Água marinha
		Bactéria marinha não cultivável	99	97	EU268233	Gastropoda <i>Nassarius semiplicatus</i>
		<i>Roseobacter</i> sp.	95	99	EU907924	Dinoflagelado
A04	Alphaproteobacteria: Rickettsiales: <i>Pelagibacter</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	GQ348049	Branquias de bivalves de zona oceânica profunda
D04	Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae	Bactéria marinha não cultivável			FJ826206	Água marinha
A05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	99	GU119325	Várias espécies de corais do caribe
B02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234107	Sedimento de estuário
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	FN582320	Cavalo marinho <i>Hippocampus guttulatus</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	98	98	HM057811	Água marinha
D10	Flavobactéria: Flavobacteriaceae	Bacteroidetes não cultivável	99	95	GQ348753	Branquias de bivalves de zona oceânica profunda
		Flavobacteriia não cultivável			AM279180	Água marinha
C05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234106	Água de estuário
G09	Gammaproteobacteria: Vibrionaceae: <i>Enterovibrio</i>	Vibrionaceae	99	98	GQ391997	Octocoral <i>Pseudopterogorgia americana</i>
		Vibrionaceae	99	98	DQ005883	Ouriço-do-mar

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	Con	ID	Acesso	Origem
G08	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.	9	99	AY664232	Água marinha
		<i>Cyanobacterium</i>	99	99	HM057799	Água marinha
B08	Gammaproteobacteria: Alteromonadaceae	Bactéria marinha não cultivável	99	96	EU010181	Água marinha
B05	Cyanobacteria: Bacillariophyta	<i>Cyanobacterium</i>	99	96	GQ347794	Branquias de bivalves de zona oceânica profunda
E09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234106	Água de estuário
E07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057814	Água marinha
		<i>Roseobacter</i> sp.			EF092182	Esponja <i>Axinella</i> <i>corrugata</i>
B07	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Jannaschia</i>	<i>Roseovarius pacificus</i>	99	96	NR_043564	Sedimento marinho
		<i>Roseovarius</i> sp.	99	96	FJ999566	Esponja <i>Haliclona</i> <i>simulans</i>
E06	Alphaproteobacteria: Rickettsiales: <i>Pelagibacter</i>	Bactéria não cultivável	99	99	EF572977	Água marinha
C03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria não cultivável	99	99	FJ809133	Corais <i>Montipora</i> <i>aequituberculata</i> e <i>Acropora millepora</i>
E05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i> sp.			AB294982	Águas termais oceânicas
D01	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	98	99	DQ234107	Água de estuário
H10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	99	HM057762	Água marinha
		Rhodobacteraceae não cultivável			DQ234106	Água de estuário
		<i>Roseobacter</i> sp.			EF092182	Esponja <i>Axinella</i> <i>corrugata</i>
E04	Flavobactéria: Flavobacteriaceae	<i>Flavobacteriia</i> não cultivável	99	98	AM279165	Água Marinha

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	con	ID	Acesso	Origem
F09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	AJ633989	Cephalopoda <i>Euprymna scolopes</i>
H11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	EU010163	Água de estuário
B09	Bacteroidetes	Bactéria não cultivável	99	99	HM023426	Água marinha
D02	Bacteroidetes	Bactéria marinha não cultivável	99	99	JN166135	Água marinha
E03	Alphaproteobacteria:Rhodoba cteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Ruegeria</i> sp.	99	99	AB294982	Águas termais oceânicas
E02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234106	Água de estuário
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	98	HM057623	Água marinha
97E10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria marinha não cultivável	97	99	EU010128	Água marinha
A12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	97	99	DQ234107	Água de estuário
H02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Alphaproteobacteria não cultivável	99	96	EF123331	Coral <i>Siderastrea</i> <i>siderea</i>
		Rhodobacterales não cultivável	99	96	HM798724	Água marinha
H03	Gammaproteobacteria: Alteromonadaceae	Gammaproteobacteria não cultivável	99	93	EF061962	Sedimento de estuário
H04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	97	99	HM057810	Água marinha
A10	Gammaproteobacteria: Alteromonadaceae: <i>Alteromonas</i>	micro-organismo marinho não cultivável	99	99	EU188196	Água marinha
H05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	99	EU010128	Água marinha
F10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	92	GU981817	Esponja de estuário

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Continuação.*

UTO	RDP	Ncbi	con	ID	Acesso	Origem
H08	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	98	EU010128	Água marinha
G12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234106	Água de estuário
G11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Jannaschia</i>	Rhodobacter sp. <i>Jannaschia pohangensis</i>	99 99	96 96	FJ997595 NR_043910	Água marinha Sedimento marinho
H12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	98	EU010128	Água marinha
F11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234107	Água de estuário
H09	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável <i>Roseobacter</i> sp.	92 98	94 77	EF573683 EF092182	Água marinha Esponja Axinella corrugata
F12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Ruegeria</i> sp.	99	99	AB294982	Águas termais oceânicas
H07	Cyanobacteria	Bactéria não cultivável	99	99	GU119491	Várias espécies de corais do caribe
G05	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	<i>Pelagibaca</i> sp.	99	99	FJ745173	Água marinha
G04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável <i>Marinovum</i> sp.	99 99	97 97	GU981846 FJ745134	Esponja de estuário Água marinha
G06	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234107	Água de estuário
H01	Alphaproteobacteria: Rickettsiales: <i>Pelagibacter</i>	Bactéria marinha não cultivável	99	99	JN233641	Água marinha
A11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Bactéria marinha não cultivável	97	99	EU010163	Água marinha
D12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Jannaschia</i>	<i>Jannaschia pohangensis</i> <i>Roseovarius pacificus</i> <i>Roseovarius</i> sp.	99 99 97	99 99 99	NR_043910 NR_043564 EU742628	Sedimento marinho Sedimento marinho profundo Água marinha profunda

Tabela D: Afiliação filogenética das UTOs encontradas na água do mar, classificadas usando os bancos de dados RDP e Genbank (Blastn). Con: Confiança (em %), ID: Identidade (em %). *Conclusão.*

UTO	RDP	Ncbi	con	ID	Acesso	Origem
D11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae bacterium	97	99	EU697081	Sedimento de estuário
		Rhodobacteraceae não cultivável	97	99	FJ403088	Coral <i>Montastrea faveolata</i>
F04	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Roseobacter</i> sp.	99	99	EF092182	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
F03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Rhodobacteraceae não cultivável	99	99	DQ234107	Água de estuário
G01	Bacteroidetes	Bactéria não cultivável	94	97	HM572105	Água marinha
		Bactéria não cultivável	99	92	EU369119	Ostras
G03	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	95	GU981847	Esponja de estuário
		Bactéria não cultivável	99	95	AY654754	Coral <i>Oculina patagonica</i>
G02	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EU780331	Coral <i>Turbinaria mesenterina</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	97	FJ403086	Coral <i>Montastre faveolata</i>
		Alphaproteobacteria não cultivável	99	97	EF123421	Coral <i>Siderastrea siderea</i>
		Rhodobacteraceae não cultivável	99	97	HQ270275	Esponjas <i>Xestospongia muta</i> and <i>Xestospongia testudinaria</i>
		Rhodobacterales não cultivável	99	97	EF215745	Água marinha
E12	Bacteroidetes: Flavobactériaceae	Bactéria não cultivável	99	97	EF573037	Água marinha
E11	Cyanobacteria	Cyanobacteria não cultivável	99	100	HM057705	Água marinha
C10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria marinha não cultivável	99	99	EU010128	Água marinha
B11	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae	Bactéria não cultivável	99	99	HM023362	Água marinha
B10	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Roseovarius</i>	<i>Roseobacter</i> sp.	97	99	EF092182	Esponja <i>Axinella corrugata</i>
C11	Alphaproteobacteria: Rickettsiales: <i>Pelagibacter</i>	SAR11 cluster Alphaproteobacterium	99	99	JN547477	Água marinha
C12	Alphaproteobacteria: Rhodobacteraceae: <i>Loktanella</i>	Bactéria não cultivável	99	97	FJ203462	Coral <i>Montastraea faveolata</i>

