

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DOS MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
ASCÍDIAS COLONIAIS (TUNICATA, ASCIDIACEA)**

**FORTALEZA
2010**

FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DOS MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
ASCÍDIAS COLONIAIS (TUNICATA, ASCIDIACEA)**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

Co-orientadora: Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2010

Oliveira, Francisca Andréa Silva

Estudo da Diversidade dos Micro-Organismos Associados a Ascídias Coloniais (TUNICATA, ASCIDIACEA) /Francisca Andréa da Silva Oliveira. 2010.

73f.; il. color. enc.

Orientador: Tito Monteiro da Cruz Lotufo

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.

Após a finalização dos trabalhos da defesa de Dissertação de Mestrado da aluna, **FRANCISCA ANDRÉA DA SILVA OLIVIERA**, intitulada “**Estudo da Diversidade dos Micro-organismos Associados a Ascídias Coloniais (TUNICATA, ASCIDIACEA)**”, a Banca Examinadora considerando o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada considera a **DISSERTAÇÃO APROVADA**.

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo _____
(Orientador)

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias _____
(Membro interno)

Prof(a). Dra. Vânia Maria Maciel Melo _____
(Membro interno)

Fortaleza, 13 de Agosto de 2010

Dedico este trabalho a minha filha Thaís,
ao meu companheiro Clerton e aos meus
pais Thaís e Cláudio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelo amor incondicional e por sua maravilhosa presença em minha vida, me dando a certeza que vou conseguir todas as vezes que penso que irei fracassar.

Ao Clerton e Thais, pessoas que conseguem deixar todos os meus dias mais felizes. Amo vocês.

Ao meus pais, Thais e Cláudio, por tudo que foi feito e pelo que ainda irão fazer por mim, obrigada pelos passos que me ajudaram a dar, hoje sei quanto sacrifício foi feito por vocês para conseguir educar a este meio time de futebol.

Aos meus irmãos, Socorro, Cláudia, Ricardo, Patrícia, Raquel e Esther, a nossa união nos ajuda a vencer.

Ao meu orientador prof. Dr. Tito Lotufo pela confiança, apoio e ensinamentos e por acreditar mesmo de longe que eu iria terminar esta dissertação. Muito obrigada!

À professora Dra. Vânia Melo, pelo primeiro sorriso quando cheguei ao seu laboratório, obrigada pelo apoio, ensinamentos e dedicação. Agradeço ainda, por me apresentar o fantástico mundo molecular.

Ao professor Wladimir Ronald Lobo Farias, por participar da banca e pelas sugestões.

À professora Dra. Mariana Cabral de Oliveira, pela oportunidade concedida no curso e estágio realizado no Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). Agradeço ainda pelos ensinamentos, atenção, hospitalidade e preciosas sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgão financiador da bolsa concedida durante estes dois anos de estudos.

A todos do Departamento de Engenharia de Pesca, professores, servidores, enfim aos que contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Instituto de Ciências do Mar e as pessoas que ali trabalham, agradeço pela colaboração.

A todos do LECA; Amanda, Caio, Felipe, Carlos, Douglas, Raquel, Tarciana e especialmente Tereza, Eduardo, Carolzinha, Ronaldo e Wander, agradeço sinceramente por todos os conselhos e ajudas.

Aos laboratórios vizinhos, Equal e Ecotox, que tornam nossos almoços comunitários em uma refeição maravilhosa, e ainda pela hora do cafezinho e conversas animadoras.

A todos que fazem parte do Lembiotech; Alysson, Bárbara, Dani, Denise, Dulce, Elis, Geórgia, Glauber, Hortência, Júlio, Kizeane, Laís, Lidiane, Lílian, Luína, Manu, Natália, Raphaela, Tallita, Técia, Vanessa Câmara, Vanessa Nogueira e Wal, todos vocês têm um jeito especial de ser e ajudar alguém. Um agradecimento carinhoso a todos, pelas muitas ou infinitas ajudas concedidas.

A Socorro Vale, Tereza, Felipe, Tony, Carolzinha e Raquel, pela ajuda em campo é sempre bom saber que tem alguém por perto.

A Manu e Carol da (USP), pela atenção concedida durante minha permanência nesta universidade.

Um agradecimento muito especial o; Alysson, Denise, Nessa, Lidi, Manu, Tallita, Geórgia, Raphaela e Wal, seus ensinamentos, conselhos e ajudas foram imprescindíveis.

A Luiz Bezerra (Buda) pela produção do mapa.

Ao seu Valdenor por deixar toda a área de trabalho agradável para o desenvolvimento das atividades. Você é muito importante.

Agradeço ainda por todos que fazem parte da minha vida, familiares e amigos que sempre me ajudam na minha caminhada.

A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquiere o conhecimento.

Provérbios 4; 7
Bíblia Sagrada

RESUMO

A simbiose com micro-organismos é bem conhecida em diversos táxons de invertebrados marinhos. No entanto, pouca ou quase nenhuma informação há sobre essa interação para os animais do litoral brasileiro. Micro-organismos tem sido apontados ainda como os responsáveis pela produção de compostos com atividades biológicas interessantes presentes em animais como as ascídias. Diante disso, o objetivo da presente pesquisa foi o de estudar a microbiota associada a superfície externa de ascídias coloniais, com ênfase em cianobactérias simbiontes, classificando, conhecendo o perfil de diversidade da comunidade e identificando associações específicas entre componentes da microbiota e ascídias hospedeiras. O estudo foi realizado com duas espécies de ascídias: *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp., coletadas na região oeste do Estado do Ceará (Brasil), na praia dos Dois Coqueiros e Porto do Pecém, respectivamente. A microbiota foi analisada inicialmente por meio da microscopia ótica e posteriormente por técnicas moleculares como: eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e biblioteca do 16S rRNA. A análise microscópica evidenciou uma comunidade composta por cianobactérias e diatomáceas. Os resultados do DGGE mostraram o perfil da comunidade em termos de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), com a maior diversidade de UTOs apontada na ascídia *Didemnum galacteum*. A microbiota presente na água do mar onde os espécimes foram coletados foi comparada com a microbiota da superfície da túnica da ascídia, e os resultados evidenciaram que o número de UTOs é maior na água do mar e que a ascídia apresenta uma microbiota específica. A comunidade microbiana analisada pela biblioteca do 16S rRNA revelou a dominância de bactérias nas duas bibliotecas analisadas. Dentre as bactérias o táxon dominante em todos os casos foi Proteobacteria, com Alphaproteobacteria para a ascídia *Didemnum galacteum* e Gammaproteobacteria para a ascídia *Cystodytes* sp. Outros representantes como Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Cyanobacteria e Bactérias não cultiváveis foram evidenciadas na microbiota de *Didemnum galacteum*, porém em menor proporção.

ABSTRACT

The symbiosis with microorganisms is well known for many marine invertebrate taxa. Despite that, information about these interactions along the Brazilian coast are scanty or even nonexistent. Microorganisms have also recognized as the real producers of interesting natural compounds extracted from marine invertebrates, such as ascidians. With that in mind, the goal of the present study was to evaluate the microbiota associated to colonial ascidians, focusing on symbiotic cyanobacterias, then classifying, estimating the community diversity, and identifying specific interactions between the microbiota and its hosts. This study assessed two ascidians species *Didemnum galacteum* and *Cystodytes* sp. collected in the west coast of Ceara state (Brazil), at Dois Coqueiros beach and port of Pecém, respectively. The microbiota was analyzed initially through optical microscopy and subsequently by molecular techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S rRNA library. The microscopic analysis showed a community comprising cyanobacteria and diatoms. DGGE results presented the community profile in terms of Operational Taxonomic Units (OTUs), pointing out *Didemnum galacteum* as the most diverse. The microbiota in the seawater where specimens were collected was compared to that from the ascidians' tunic surfaces, and results showed higher number of OTUs in the water, and a more specific microbiota in ascidians. The microbiota community studied by 16S rRNA library revealed dominance of bacteria in both libraries assessed, in which Proteobacteria taxon prevailed with either Alphaproteobacteria in *Didemnum galacteum*, and Gammaproteobacteria in *Cystodytes* sp. Others, such as Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Cyanobacteria and uncultured bacteria were evident in *Didemnum galacteum*, but in a lesser proportion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático mostrando a organização interna de uma ascídia. Em (a): Arranjo dos zoóides na túnica; em (b) Anatomia de uma ascídia solitária. Fonte: Monniot, Monniot e Laboutre, 1991, Brusca e Brusca, 2003, respectivamente.	18
Figura 2 – Aspecto externo de ascídias. Em (a): Ascídia colonial <i>Didemnum ligulum</i> ; em (b) Ascídia solitária <i>Phalusia nigra</i> . Fotos: (a) Tito Lotufo, (b) Sérgio Rodrigues.....	18
Figura 3 - Árvore filogenética, com a distribuição dos três domínios, Bacteria, Archaea e Eucarya (Woese, <i>et al.</i> , 1990).....	20
Figura 4 – Área de estudo (Região nordeste, estado do Ceará, destacando a Praia dos Dois Coqueiros e Porto do Pecém). Foto: Luiz Bezerra, 2010.	23
Figura 5 – Local de coleta. a) Recifes de arenito da Praia dos Dois Coqueiros, b) Pilares do Porto do Pecém. Foto: a) Sandra Paiva, 2010; b) Acervo pessoal.	24
Figura 6 – Cronograma do desenvolvimento das atividades realizadas neste estudo.	25
Figura 7 – Procedimento das etapas desenvolvidas no estudo do biofilme retirado da superfície externa das ascídias, usando a técnica do DGGE adaptado de Nakatsu, (2007).	29
Figura 8 – Em (a): Aspecto externo da ascídia colonial <i>Didemnum galacteum</i> ; em (b) Espículas de <i>D. galacteum</i> . Fotos: (a) Acervo pessoal, (b) Lotufo e Dias (2007).	35
Figura 9 – Aspecto externo de <i>Cystodytes</i> sp. (Acervo pessoal).....	36
Figura 12 – Bacillariophyceae 1 (Acervo pessoal).....	38
Figura 13 – <i>Cylindrotheca</i> (Acervo pessoal).....	39
Figura 14 – Bacillariophyceae 2 (Acervo pessoal).....	39
Figura 15 – Variação da forma, em (a) Células diferentes quanto ao tamanho, (b) Células mesma dimensão e em (c) Células se dividindo por fissão binária (Acervo pessoal).....	40
Figura 16 – Fotografia dos géis em triplicata – M – marcador 1 Kb. 1a) microbiota da superfície da túnica de <i>Cystodytes</i> sp.; 2a) microbiota da água do mar (Pecém); 1b) microbiota da superfície de <i>Didemnum galacteum</i> ; 2b) microbiota da água do mar (Praia dos Dois Coqueiros).	41
Figura 17 – Em (a): Agrupamento hierárquico com base na distância de Jaccard e no algoritmo UPGMA para a comunidade de bactérias da superfície da túnica e da microbiota da água do mar onde as amostras foram coletadas; 1- Superfície da túnica de <i>Cystodytes</i> sp (Pecém), 2- Água do mar (Pecém), 3- Água do mar (Praia dos Dois Coqueiros) e 4- Superfície da túnica de <i>Didemnum galacteum</i> (Praia dos Dois Coqueiros); em (b): Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as quatro amostras.....	42

Figura 18 – Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs).....	43
Figura 19 – Diagrama de Venn, UTOs compartilhadas e exclusivas entre as amostras	43
Figura 20 – Dominância dos táxons de Proteobacteria para cada amostra. Em (a): microbiota da ascídia <i>D. galacteum</i> ; em (b) microbiota da ascídia <i>Cystodytes</i> sp.....	46
Figura 21 – Diversidade dos clones da microbiota da superfície da túnica <i>Didemnum galacteum</i> e <i>Cystodytes</i> sp.....	47
Figura 22 – Curva de rarefação para a microbiota da superfície da túnica de <i>Didemnum galacteum</i>	48
Figura 23 – Curva de rarefação para a microbiota da superfície da túnica de <i>Cystodytes</i> sp...	48
Figura 24 – Índice de equitatividade para o número de UTOs de <i>Didemnum galacteum</i>	49
Figura 25 – Índice de equitatividade para o número de UTOs de <i>Cystodytes</i> sp.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gêneros de cianobactérias e diatomáceas observadas no biofilme analisado da superfície externa das ascídias por meio de microscopia ótica.	37
Tabela 2 – Valores do índice de Shannon/Wierner (H') e índice de equitatividade de Pielou (J') para os dois locais: Praia dos Dois Coqueiros (microbiota da superfície de <i>D. galacteum</i> e da água do mar), Pecém (microbiota da superfície de <i>Cystodytes</i> sp. e água do mar).....	44
Tabela 3 – Número de clones e UTOs para a microbiota da superfície da túnica de <i>Didemnum galacteum</i> e <i>Cystodytes</i> sp.	45
Tabela 4 – Diversidade da microbiota associada a superfície da túnica de ascídias hospedeiras	45
Tabela 5 – Tabela de classificação das sequências do 16S rDNA, obtidas por meio de comparação dos dados do GenBank, para a superfície da túnica de <i>Didemnum galacteum</i>	50
Tabela 6 – Tabela de classificação das sequências do 16S rDNA, obtidas por meio de comparação dos dados do GenBank, para a superfície da túnica de <i>Cystodytes</i> sp.	54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CTAB	Brometo de Cetiltrimetiâmonio
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetrácetico
H'	Índice de Diversidade de Shannon
J'	Índice de equitatividade de Pielou
KCl	Cloreto de Potássio
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar, UFC
LECA	Laboratório de Ecologia Animal
LEMBIOTECH	Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia
LB	Luria – Bertani
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDS	Escalonamento Multidimensional Não Métrico
PCR	Reação Em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Tris EDTA

TBE	Tris Borato EDTA
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTO	Unidade Taxonômica operacional

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiii
1 – INTRODUÇÃO	17
2 – OBJETIVO GERAL	22
2.1 – Objetivos Específicos	22
3 – MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 – Área de estudo	23
3.2 – Coleta e fixação dos animais	24
3.3 – Identificação das colônias de ascídias	26
3.4 – Análises morfológicas dos simbiontes	26
3.5 – Extração do DNA total	27
3.6 – DGGE (Eletroforese em Gel Gradiente de Desnaturação)	27
3.7 – Análises dos dados – DGGE	29
3.8 – Biblioteca da região 16S do DNA	30
3.9 – Sequenciamento	33
3.10 – Análises das sequências	34
4 – RESULTADOS	35
4.1 – Identificação das Colônias de Ascídias	35
4.2 – Análise morfológica do biofilme da superfície da túnica das ascídias	36
4.4 – Clonagem e sequenciamento	44
5 – DISCUSSÃO	55

6 – CONCLUSÕES	62
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8 – APÊNDICE	69

1 – INTRODUÇÃO

Estima-se que a vida nos oceanos tenha surgido há aproximadamente 3,6 bilhões de anos e, apesar de todo esse tempo, ainda não se conseguiu conhecer e entender toda a diversidade e complexidade desse ambiente, que abriga quase todos os grupos de organismos, muitos deles exclusivos deste meio (PEREIRA; SOARES - GOMES, 2002).

Dentre estes grupos encontramos as ascídias, organismos pertencentes ao filo Chordata e subfilo Tunicata. Dos tunicados, o táxon mais representativo é Ascidiacea, com 2800 a 3000 espécies (LAMBERT, 2005). As ascídias pertencem ao filo Chordata pois possuem notocorda, tubo nervoso e fendas faríngeas em sua fase larval, características que na fase adulta podem ser perdidas, como a notocorda, ou modificadas como o tubo nervoso que é reduzido a um pequeno gânglio (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

As ascídias apresentam abundância e diversidade marcantes, além de ampla distribuição, com registros desde as regiões entremarés até as mais profundas fossas oceânicas (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998). São organismos exclusivamente marinhos, sésseis, nos quais geralmente apenas a larva apresenta uma breve motilidade até a fixação em algum substrato (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). A quase totalidade destes animais é hermafrodita, com indivíduos apresentando os dois órgãos reprodutivos (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

Dentre as ascídias são encontradas formas solitárias e coloniais (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). As formas solitárias, como o próprio nome diz, consistem de apenas um indivíduo, recoberto por uma túnica, que dá nome ao subfilo. Essa túnica, que fornece proteção e suporte ao animal, pode apresentar várias cores devido à presença de células pigmentares, e sua consistência pode ser de gelatinosa a fibrosa (GOODBODY, 1974). As formas coloniais apresentam vários indivíduos, e todos são recobertos por uma túnica comum. Algumas formas coloniais são mais complexas que as formas solitárias pois, além de compartilharem a túnica, estes organismos podem possuir um sistema cloacal comum.

As ascídias alimentam-se de material em suspensão, principalmente fitoplâncton e detritos orgânicos (MILLAR, 1971). A captação deste alimento ocorre por filtração, onde a faringe é utilizada na retenção deste alimento.

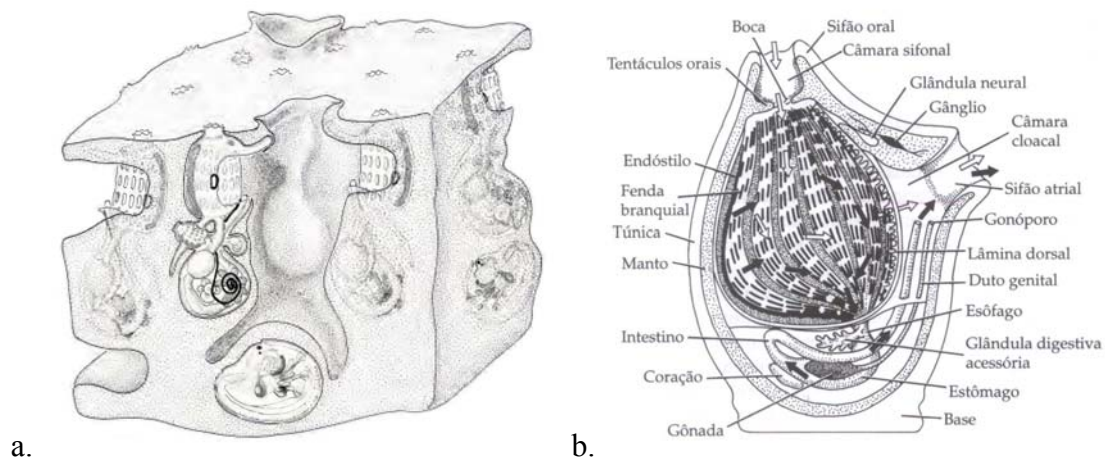


Figura 1 – Desenho esquemático mostrando a organização interna de uma ascídia. Em (a): Arranjo dos zoóides na túnica; em (b) Anatomia de uma ascídia solitária. Fonte: Monniot, Monniot e Laboutre, 1991, Brusca e Brusca, 2003, respectivamente.

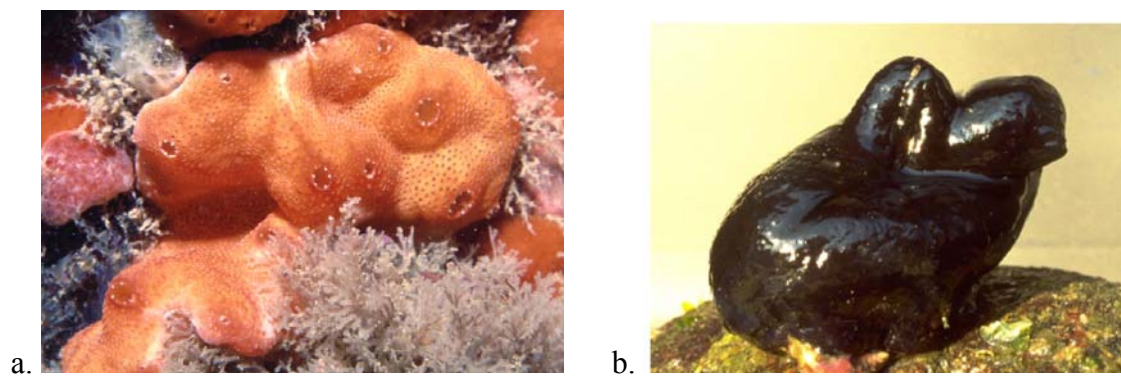


Figura 2 – Aspecto externo de ascídias. Em (a): Ascídia colonial *Didemnum ligulum*; em (b) Ascídia solitária *Phalusia nigra*. Fotos: (a) Tito Lotufo, (b) Sérgio Rodrigues.

As ascídias vem ganhando importância no setor farmacológico, devido à presença de metabólitos secundários com atividades interessantes (JIMENEZ *et al.*, 2003). Contudo, estudos recentes têm mostrado que a síntese destes compostos muitas vezes não é oriunda do animal, mas de micro-organismos, sejam eles provenientes da dieta alimentar ou simbiose (DUNLAP *et al.*, 2007; SCHMIDT; SUDEK; HAYGOOD, 2004).

Muitos trabalhos apontam para a simbiose de invertebrados marinhos com diversos grupos de micro-organismos (TAIT; CARMAN; SIEVERT, 2007). Exemplos conhecidos desta associação podem ser observados na maioria dos grandes táxons animais com representantes marinhos como Ascidiacea (MONNIOT; MONNIOT; LABOUE, 1991; PÉREZ-MATOS; ROSADO; GOVIND, 2007), Porifera (LEE; LEE; LEE, 2001; USHER, 2008) e Cnidaria (MAGALON; FLOT; BAUDRY, 2007; WEGLEY *et al.*, 2007).

Dentre a diversidade de organismos simbiotes podemos destacar as bactérias, cianobactérias, algas filamentosas e diatomáceas (HIROSE; UCHIDA; MURAKAMI, 2009; LAMBERT, 1968; MARTÍNEZ - GARCÍA *et al.*, 2007).

No caso das ascídias, estes simbiotes podem localizar-se intracelularmente, em tecidos mais expostos do hospedeiro ou extracelularmente, com os simbiotes inseridos dentro do corpo do animal (COX, 1986; TAIT; CARMAN; SIEVERT, 2007). Quando adquiridos do ambiente, estes simbiotes são transmitidos horizontalmente, ao passo que na transmissão vertical os simbiotes são passados para gerações futuras (HIROSE; FUKUDA, 2006; HIROSE; HIROSE, 2007; MOSS *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos mostraram que ascídias pertencentes às famílias Didemnidae e Polycitoridae são hospedeiras de organismos fotosimbiotes (HIROSE; FUKUDA, 2006; LEWIN; CHENG; LAFARGUE, 1980; OKA; SUETSUGU; HIROSE, 2005) e um exemplo conhecido deste tipo de interação com as ascídias ocorre com a cianobactéria do gênero *Prochloron* (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991).

Newcomb e Pugh (1975) e Lewin (1975) foram os primeiros a registrarem esta interação. Os primeiros autores apontaram essa interação em ascídias encontradas na Grande Barreira de Corais na Austrália, com os simbiotes na cavidade cloacal de ascídias da família Didemnidae. Já o segundo autor verificou essa interação para espécimes de ascídias do México, com os simbiotes presentes na superfície externa de didemnídeos.

Hirose e Maruyama (2004) avaliaram os benefícios desta interação. Segundo esses autores os simbiotes são protegidos contra raios ultravioletas pela túnica do hospedeiro, havendo também o fornecimento de nitrogênio do hospedeiro para o simbiote, mas sua importância ainda é discutível. Os autores destacam ainda os benefícios que os hospedeiros recebem dos simbiotes, listando como principais a fixação de carbono e a proteção contra os predadores.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos focando primariamente o aspecto biológico deste simbiote (LEWIN; WITHERS, 1975; WITHERS *et al.*, 1978) assim como a diversidade de ascídias hospedeiras (KOTT, 1984; KOTT; PARRY; COX, 1984).

A descoberta desta cianobactéria levou muitos pesquisadores acreditarem que este grupo, por apresentar clorofila b e nenhuma ficobilina (LEWIN; WITHERS, 1975), tivesse originado os cloroplastos, no entanto estudos moleculares revelaram não haver nenhuma relação entre ambos (PALENIK; HASELKORN, 1992). Urbach, Robertson e Chisholm (1992), registraram que a presença de clorofila b e ausência de ficobilinas surgiram em tempos diferentes na evolução das cianobactérias, e que o táxon Prochlorophyta, deveria ser

inserido dentro do grupo das cianobactérias. Todavia, esta classificação permaneceu, e as Prochlorophyta foram inseridas como uma subclasse dentro de Cyanophyta (LEWIN, 2002).

Todos estes estudos listados anteriormente foram realizados para espécimes de ascídias em simbiose com *Prochloron* do Oceano Pacífico. Pouco ou quase nada se conhece a esse respeito no Atlântico. O que existe é um trabalho realizado por Lewin, Cheng e Lafargue (1980), para espécimes de ascídias do Caribe. Como muito dos micro-organismos, estas cianobactérias também não são cultivadas. Apesar de não haver obtido sucesso no cultivo que durou apenas 15 dias, deve-se ressaltar como tentativa os experimentos realizados por Patterson e Withers (1982).

Segundo Pace (1996) menos de 1% dos micro-organismos podem ser cultivados pelo uso de técnicas clássicas. Este fato vem demonstrar o pouco conhecimento que se tem da diversidade de micro-organismos presentes no ambiente. Nas últimas décadas foram desenvolvidas diversas técnicas que permitiriam avaliar a biodiversidade microbiana. Lane *et al.*, (1985) relatam a importância do uso do 16S rRNA nas análises filogenéticas, devido à informação contida nesta região e sua distribuição universal.

Woese *et al.*, (1990), através do uso da região do 16S rRNA classificou os organismos em três domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya (Figura 3).

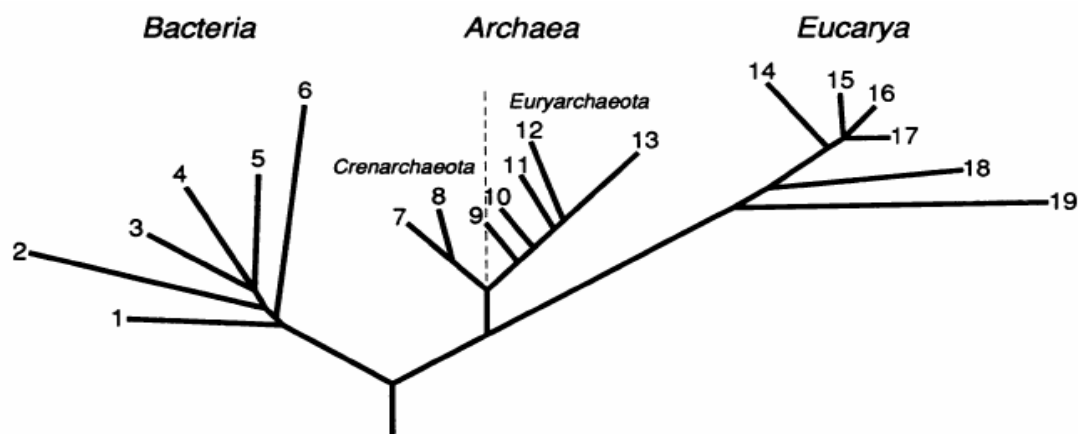


Figura 3 - Árvore filogenética, com a distribuição dos três domínios, Bacteria, Archaea e Eucarya (Woese, *et al.*, 1990).

As bactérias estão presentes em todos os habitats, suportando as mais diversas condições ambientais (MANFIO, 2006), além de serem fundamentais na fixação e ciclagem de nutrientes (NETO; WALLNER-KERSANACH; PATCHINEELAM, 2008), sendo indispensáveis ao equilíbrio do ecossistema. Os ribossomos 70S dos procariotos possuem três

fragmentos de RNA em sua estrutura, conhecidos como 5S, 16S e 23S (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). De acordo com os mesmos autores, a maioria dos estudos utiliza como ferramenta molecular a região do 16S, por apresentar sequências conservadas, onde modificações fazem com que ela deixe de ser funcional.

O conhecimento sobre a ecologia microbiana em ambientes aquáticos, ainda é insuficiente, sendo muitos trabalhos relacionados à análise quantitativa. Com isso torna-se necessário conhecer qualitativamente a comunidade, tentando entender as funções de seus componentes e a sua interação com o meio ambiente (NETO; WALLNER-KERSANACH; PATCHINEELAM, 2008).

A busca na literatura por estudos mostrando a microbiota associada a ascídias no Brasil revela muitas lacunas. Praticamente não há nenhuma informação sobre o tipo de associação simbiótica entre estes invertebrados e micro-organismos. Como exposto anteriormente, diferentes estudos têm mostrado que as ascídias abrigam uma comunidade microbiana diversa. Com isso é necessário realizar um estudo sobre a diversidade destes micro-organismos, tentando conhecer e classificar esta microbiota.

No litoral cearense as ascídias estão presentes sobre os afloramentos de arenito no entremarés, especialmente em áreas sombreadas. Para a região são registradas 27 espécies, dentre estas algumas são representativas pela sua abundância, um exemplo é a espécie *Cystodytes* sp.(LOTUFO; SILVA, 2006). Outra espécie tal como *Didemnum galacteum*, descrita por Lotufo e Dias (2007) para a costa brasileira, também é bastante comum sobre os substratos consolidados do litoral cearense. Estas duas espécies de ascídias são encontradas no ambiente abrigando um biofilme em sua superfície e até o presente momento não há uma análise da composição desta microbiota, o que vem revelar a importância da realização deste estudo.

Desta forma, este trabalho pretende avaliar através da identificação morfológica e do estudo da região do 16S rRNA a comunidade microbiana da superfície externa de duas espécies de ascídias da costa oeste do Estado do Ceará, dando ênfase à identificação e classificação de cianobactérias simbiotes.

2 – OBJETIVO GERAL

Estudar a microbiota associada às espécies de ascídias *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp da costa oeste do Ceará, com ênfase em cianobactérias simbiotes.

2.1 – Objetivos Específicos

- Classificar a microbiota associada às espécies de ascídias *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp;
- Conhecer o padrão da estrutura e diversidade da comunidade microbiana associada às espécies de ascídias *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp.
- Identificar associações específicas entre componentes da microbiota e ascídias hospedeiras.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Área de estudo

A coleta das ascídias foi feita em duas praias da costa cearense, Praia dos Dois Coqueiros ($03^{\circ}41'29''S - 038^{\circ}36'10''W$) e Porto do Pecém ($03^{\circ}32'02''S - 038^{\circ}47'58''W$) (Figura 4). A coleta se deu nestas praias pela menor distância do município de Fortaleza até os locais de coleta e também por apresentarem os espécimes de interesse para o desenvolvimento da pesquisa. A praia dos Dois Coqueiros está dentro da Região Metropolitana de Fortaleza (RMF), no município de Caucaia a 35 Km de Fortaleza. Destaca-se por apresentar recifes de arenito que abrigam uma grande diversidade de organismos. O terminal do Pecém é uma área portuária de suma importância no Nordeste brasileiro, tem um intenso aporte de embarcações vindas de vários locais do mundo. Localiza-se no município de São Gonçalo do Amarante, dentro da RMF, a 60 km da capital. Seus pilares servem de substrato abrigando uma gama de organismos incrustantes, principalmente ascídias.

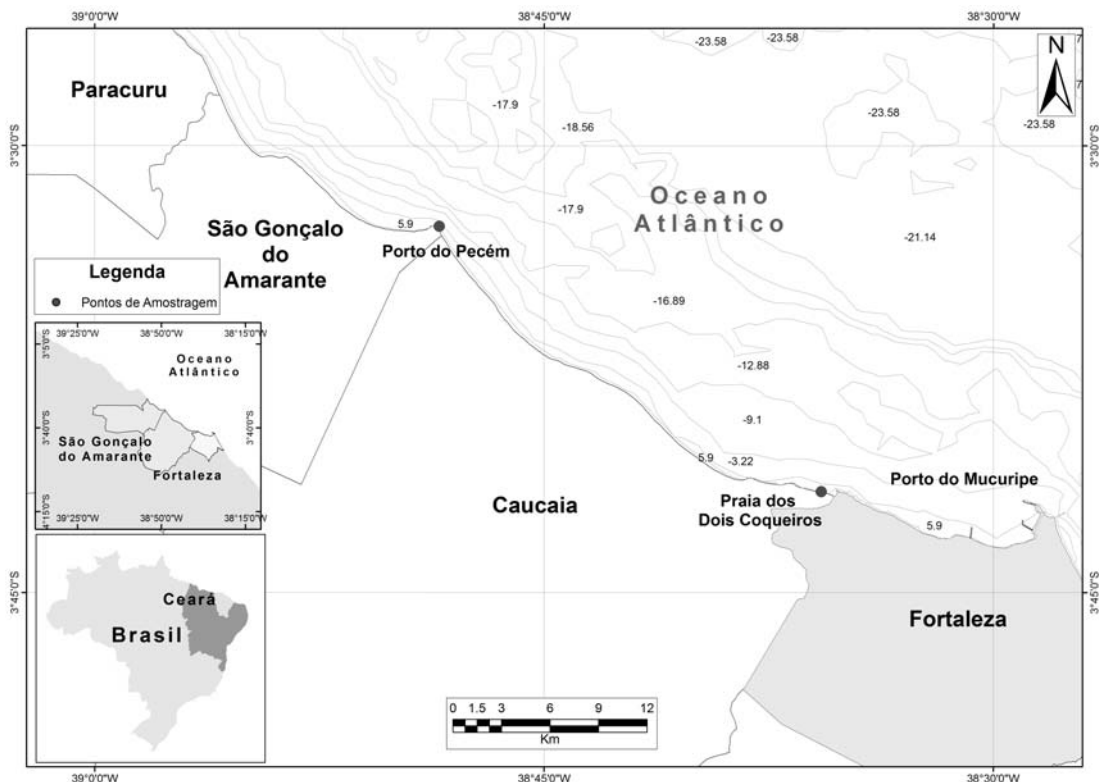


Figura 4 – Área de estudo (Região nordeste, estado do Ceará, destacando a Praia dos Dois Coqueiros e Porto do Pecém). Foto: Luiz Bezerra, 2010.

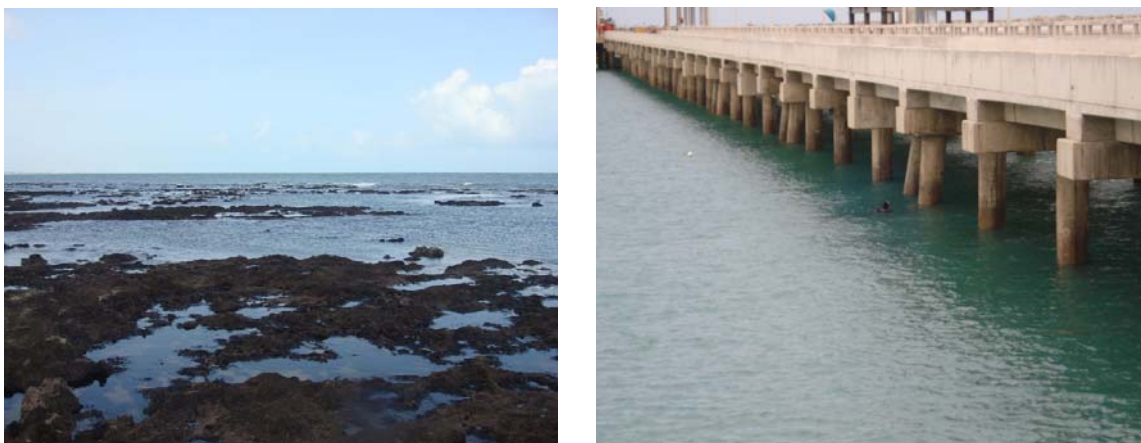


Figura 5 – Local de coleta. a) Recifes de arenito da Praia dos Dois Coqueiros, b) Pilares do Porto do Pecém. Foto: a) Sandra Paiva, 2010; b) Acervo pessoal.

3.2 – Coleta e fixação dos animais

As coletas foram realizadas na região de mesolitoral, compreendida por substrato rochoso, que fica entre a faixa de areia e a zona de batimento das ondas (Figura 5a). Na faixa de mesolitoral a coleta foi realizada durante as baixamare diurnas de sizígia. Já no porto do Pecém (Figura 5b), a coleta ocorreu por meio de mergulho autônomo nos pilares a uma profundidade de até 6 m. As amostras foram removidas cuidadosamente de seus substratos com o auxílio de uma espátula metálica, dependendo da fragilidade das colônias também era utilizada uma pinça na remoção das mesmas. O critério utilizado na seleção das espécies de ascídias para esta pesquisa foi a presença do biofilme na superfície externa da túnica. Até o momento dentre as espécies de ascídias encontradas no litoral oeste do Estado do Ceará foi observado a presença deste apenas em *Didemnum galacteum*, *Cystodytes* sp. e *Didemnum ligulum*. A espécie de ascídia *D. ligulum* não foi selecionada durante a pesquisa devido a ausência do biofilme no momento das coletas.

Todas as etapas das atividades realizadas para o desenvolvimento deste estudo estão descritas a seguir (Figura 6).

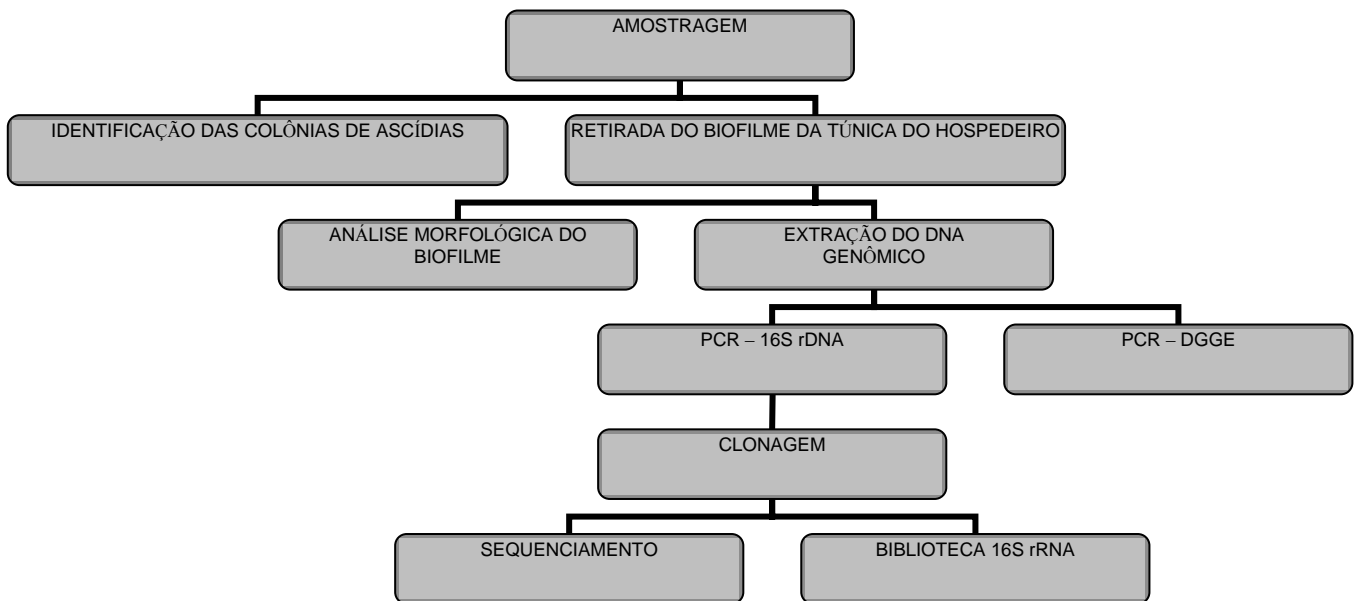


Figura 6 – Cronograma do desenvolvimento das atividades realizadas neste estudo.

Foram removidos cerca de 15 colônias de cada espécie, não levando em consideração o tamanho da colônia, apenas a presença do biofilme. Após a remoção, os animais foram lavados com água deionizada e acondicionados em sacos plásticos com tampão fosfato pH 7,4, de acordo com a metodologia utilizada por Munchhoff *et al.*, (2007). O tampão fosfato extraiu as células do biofilme e por apresentar pH próximo do neutro impediu o seu rompimento, favorecendo assim sua observação em microscópio ótico. Em seguida as amostras foram levadas ao Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (LECA – LABOMAR – UFC), para identificação do hospedeiro, análise morfológica do simbiote e estudos moleculares. No laboratório o material extraído em tampão fosfato foi homogeneizado e dividido em duas alíquotas. Uma alíquota foi utilizada na observação microscópica dos simbioses e a outra foi centrifugada a 1.500 g por 5 minutos em centrífuga da marca Zentrifugen para a formação do *pellet* que seria utilizado nas análises moleculares. O *pellet* formado pelas células foi mantido em freezer a -20°C, até a extração do seu DNA.

No mesmo ponto onde foram coletados os animais, foi também realizada a coleta de água para análise comparativa da microbiota associada. A água foi coletada com um frasco PET estéril e mantida em temperatura ambiente até a chegada ao laboratório.

Para a extração do DNA genômico da microbiota presente na água, foi imediatamente realizada a filtração da água, utilizando primeiramente um filtro de microfibras de vidro da marca Millipore com porosidade de 0,8 μ m, em uma pré-filtração para retirada de material particulado e, em seguida foi realizada a filtração em um filtro com porosidade de 0,45 μ m (Millipore) para o desenvolvimento do estudo molecular. Este último filtro foi guardado em tubo de 1,5 mL estéril e congelado a -20°C, para posterior extração do material genético contido no mesmo.

As colônias de ascídias utilizadas para a identificação da espécie foram anestesiadas com metanosulfonato de triclaína. Após 30 minutos estas colônias foram fixadas em solução salina de formol a 4%. Antes da fixação, a coloração que é utilizada na identificação da espécie foi anotada, pois é comum ela ser perdida durante o processo de fixação.

3.3 – Identificação das colônias de ascídias

Todas as observações das estruturas das colônias de ascídias foram realizadas em microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg, M5A). A identificação dos animais foi feita, seguindo bibliografia de acordo com as características descritas por Rodrigues, Rocha e Lotufo (1998) e Lotufo (2002).

3.4 – Análises morfológicas dos simbioses

As células extraídas no tampão fostato foram observadas através de microscópio óptico da marca Zeiss, modelo Standard 25, com ocular micrometrada e contraste de fase, onde foi possível fazer as análises taxonômicas. Suas formas foram registradas através de fotografias em máquina da Sony Cyber-shot, modelo DSC-W35. A identificação e descrição morfológica destas células foram feitas no menor nível taxonômico possível, baseando-se em bibliografia específica para cada grupo de acordo com Round, Crawford e Mann (1990) e Hoek, Mann e Jahns (1995).

O sistema de classificação adotado para as cianobactérias e diatomáceas foram, respectivamente, Lewin (2002) e Round, Crawford e Mann (1990).

3.5 – Extração do DNA total

Os procedimentos moleculares desenvolvidos nesse trabalho foram realizados em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da UFC. A extração do DNA genômico dos simbiontes retirados da superfície externa da ascídia e da água do mar foi realizada de acordo com o protocolo de extração de DNA – CTAB 2X descrito por Roger e Bendich (1985), com as modificações indicadas a seguir.

As quatro amostras foram lavadas 3 vezes com água destilada estéril por meio de centrifugação durante 5 minutos a 12.000 g, numa centrífuga mini-spin da marca Eppendorf. Após o descarte da água de lavagem, foram adicionados 400 µL do tampão de extração CTAB 2X e agitado em vortex da marca GV Lab – Gilson por 30 segundos. Os extratos foram então incubados em banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos.

Após a retirada dos tubos do banho-maria, os mesmos foram mantidos a temperatura ambiente até esfriarem e em seguida foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) a cada tubo com o extrato e agitado por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g durante 5 minutos, para separar a fase orgânica (inferior) da fase aquosa (superior). A etapa da adição de clorofórmio: álcool isoamílico e centrifugação foram repetidos, para uma melhor recuperação da fase superior. Após essa separação o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 905 µL de isopropanol absoluto. Depois da mistura, as soluções foram incubadas no freezer até o dia seguinte a uma temperatura de -20 °C. Após a incubação foi realizada uma centrifugação a 12.000 g durante 25 minutos.

Em seguida o *pellet* foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado e centrifugado durante 20 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* exposto à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse sendo então ressuspensionado em 50 µL de TE (10 mM: 1mM, pH 8,0) + RNase a 20 µg/mL.

3.6 – DGGE (Eletroforese em Gel Gradiente de Desnaturação)

O DGGE é uma técnica de *fingerprint*, que separa fragmentos amplificados por PCR que tenham o mesmo tamanho (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Este

estudo está sendo bastante utilizado atualmente, tanto em estudos ecológicos, como filogenéticos. Esta técnica foi utilizada nesta pesquisa com o objetivo de se conhecer o perfil da comunidade presente nas amostras, seu estudo foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Øvreas *et al.*, (1997) e adaptado por Colares (2010).

Para análise da microbiota por DGGE, foi realizada inicialmente uma reação de amplificação utilizando os iniciadores 338 GC F GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGC GGGGGCACGGACTCCTACGGGAGGCAGCA e 518 R ATTACCGCGGCTGCT GG, específicos para a região variável V3 do 16S rRNA.

Cada reação teve um volume final de 20 µL, contendo 1X de tampão, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo, 2,5 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador e 1 unidade de Taq DNA polimerase junto a 10 a 20 ng/µl do DNA total. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). O programa utilizado na amplificação do 16S rRNA PCR – DGGE , teve uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C . A última etapa foi uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Após a amplificação, foi realizada uma corrida em gel de agarose 2% para a observação em fotodocumentador ultravioleta. Como padrão de tamanho de DNA, foi utilizado um marcador de massa molecular de DNA de 1Kb.

Os géis de poliacrilamida foram preparados a 8% com gradiente de desnaturação do gel de 65%, utilizando soluções desnaturantes de 100 % (uréia a 7M e formamida a 40%) e 0% (sem uréia e formamida) na formação da desnaturação esperada. O gel correu por 4 horas a 60°C em uma voltagem constante de 200V em um tampão TAE 0,5X. Após a corrida, o gel foi corado com SYBR Green I (Molecular Probes) na concentração de 1:10.00 (v/v) durante 1 hora, utilizando-se um agitador horizontal. O gel foi observado e fotografado em fotodocumentador ultravioleta. Todo procedimento da técnica do DGGE é apresentado a seguir (Figura 7).

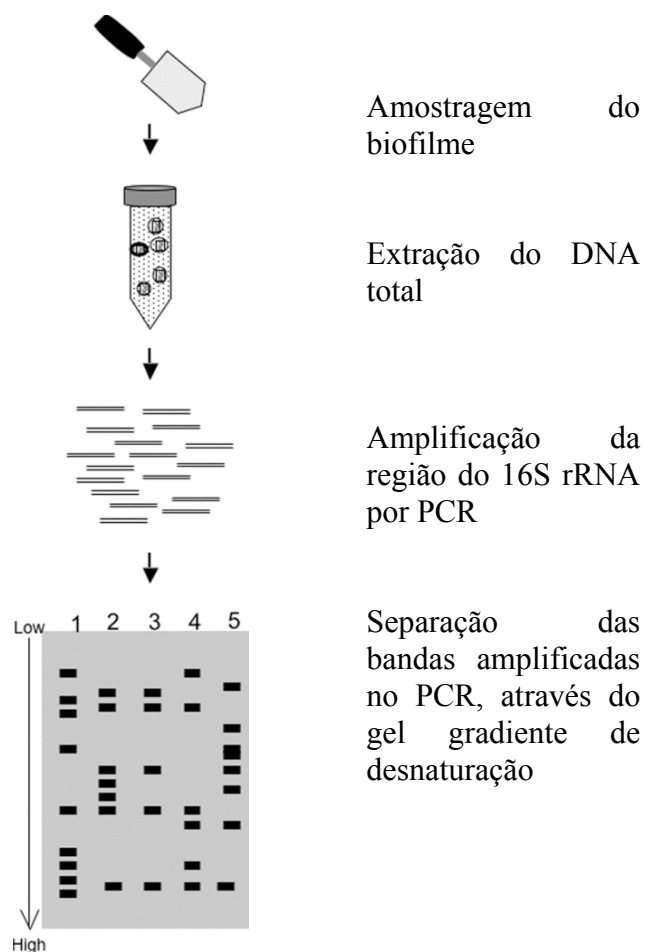


Figura 7 – Procedimento das etapas desenvolvidas no estudo do biofilme retirado da superfície externa das ascídias, usando a técnica do DGGE adaptado de Nakatsu, (2007).

3.7 – Análises dos dados – DGGE

Nas análises das imagens dos géis de DGGE foi utilizado o programa BioNumerics (Applied Mathematics, Bélgica). Este programa foi utilizado na normalização, conversão e comparação entre as bandas. O programa gerou o agrupamento hierárquico, matrizes de ausência (0) e presença (1) e análises de Escalonamento Multidimensional Não Métrico. A análise do agrupamento foi realizada usando o algoritmo Associação Média Não Ponderada (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard, com tolerância ao posicionamento das bandas de 1%. O coeficiente de Jaccard é uma medida de similaridade que utiliza dados binários e exclui a dupla ausência (VALENTIN, 2000).

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

a = Número de espécies (UTOs) comuns aos dois objetos (1-1);

b = Número de presença/ausência (1-0);

c = Número de ausência/presença (0-1).

A matriz de intensidade de bandas gerada no programa foi utilizada nas análises estatísticas de diversidade e equitatividade realizadas no software Primer 6.0. O índice de diversidade (Shannon/Wiener - H') (SHANNON, 1948) e equitatividade (Pielou - J') (PIELOU, 1967), foram calculados com a finalidade de descrever e comparar as quatro amostras analisados no estudo. A diversidade é normalmente utilizada entre espécies em estudos de comunidades ecológicas, utilizando o número de espécies e equitatividade. O índice de equitatividade demonstra a distribuição dos indivíduos dentro da comunidade.

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Onde:

H' = Diversidade de Shannon/Wiener;

p_i = Abundância relativa de cada espécie;

S = Número de espécies.

$$J' = \frac{H'}{H_{\max}}$$

Onde:

J' = Equitatividade de Pielou;

H' = Diversidade de Shannon/Wiener;

H_{\max} = Diversidade máxima.

3.8 – Biblioteca da região 16S do DNA

A região do fragmento relativo ao 16S do DNA foi amplificada por PCR utilizando iniciadores específicos para cianobactérias, 27 F AGAGTTTGATCCTGGC TCAG e 1494 R TACGGCTACCTTGTTACGAC. A reação de PCR teve um volume final de 50 μ L, contendo um volume de 10 μ L de tampão 5X, 1,25 μ L de cada dioxinucleotídeo a 10 mM, 6,0 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 0,40 μ L de Taq DNA Polimerase 5U e 5,0 μ L de cada iniciador a 5 pmol, o volume da reação foi completado com 26,4 μ L de água + DNA (10 a 100 ng/ μ L). O controle negativo das reações foi formado por todos os constituintes, exceto o DNA. A

amplificação da reação ocorreu em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) programado para uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1,5 minutos e extensão final de 72 °C por 7 minutos. Após a finalização do processo de amplificação as amostras foram retiradas do termociclador e o produto de PCR mantido a -20 °C. O gel de agarose foi preparado a 1%, com a adição de 1 g de ágar em 100 mL de TBE 0,5X - Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM, essa mistura foi levada ao micro-ondas para fusão e em seguida foi adicionada a esta 1 µL de SYBR safe DNA gel stain para observação das bandas. Após a formação do gel, foi aplicado uma mistura de 5 µL de tampão da amostra azul de bromofenol com 50 µL do produto de PCR. O marcador de massa molecular de DNA de 1 Kb foi aplicado para se saber o tamanho do fragmento amplificado. A corrida da eletroforese ocorreu a uma voltagem de 80 mA e uma corrente de 40 mA, e utilizou como tampão de corrida o TBE 0,5X.

As bandas da eletroforese foram visualizadas em fotodocumentador ultravioleta, e fotografadas utilizando máquina da marca Canon PC 1210. As bandas foram cortadas e colocadas em um tubo de 1,5 mL, previamente pesado e tarado na balança para obtenção do peso do gel.

Este gel foi purificado utilizando um Kit de purificação (promega), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de DNA foi medida após a purificação em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies).

A partir desta etapa iniciou-se a reação de ligação com o cálculo da quantidade de DNA na reação, usando 50 ng do vetor pGEM-TEasy CGCATGCTCCCGGCCGC ATGGCGGCCGCGG GAATTCGATT e razão molar de (5:1) ou (6:1).

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão molar} \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} \right)}{\text{kb tamanho de vetor}} = \text{ng inserto}$$

O vetor e o DNA foram centrifugados e em seguida coletados e colocados em tubos de 0,5 mL. A reação de ligação teve um volume final de 10 µL, usando 1 µL do tampão de ligação, 1 µL do Vetor P-GEM Easy (50 ng), 4 µL do DNA (produto de PCR), 1 µL de T4 DNA Ligase (30U/µL) e 3 µL de água estéril. Esta reação foi misturada por pipetagem e incubada por 16 horas a 4°C.

Após este tempo foi misturado em um tubo de 1,5 mL, 50 μ L de suspensão celular (*Escherichia coli*) com 2 μ L da reação de ligação. Esta mistura foi transferida para a cubeta previamente resfriada, em seguida colocada no eletroporador da marca ECM 399 BTX e adicionado o pulso.

A cubeta foi removida e imediatamente seu produto foi retirado e misturado a 1 mL do meio SOC. Essa mistura foi incubada no agitador por 1,5 hora, a 37 °C, 150 RPM. Após esse período foi plaqueado volumes de 50 μ L e 100 μ L, em placas de LB com antibiótico; ampicilina, x-Gal e IPTG. As placas foram incubadas a 37 °C, por toda noite. As colônias que receberam o plasmídeo ficaram brancas formando colônias de clones e as que não receberam o plasmídeo ficaram azuis.

Com a formação dos clones iniciou-se o processo de preparação de plasmídeos em microplacas. Primeiramente os clones foram crescidos em meio de cultura CIRCLE GROW com ampicilina. Para isto foi colocado 1,2 mL do meio em cada poço de um bloco de crescimento estéril de 96 poços. As colônias individuais foram removidas das placas e inoculadas com o auxílio de um palito de madeira estéril a cada poço que continha o meio. Em seguida os blocos foram selados com adesivo e colocados no agitador por 22 horas a 37 °C e 200 RPM, para crescimento das células.

Após o crescimento celular foi retirado de cada poço do bloco 150 μ L do meio com células e colocado em uma placa de fundo U também de 96 poços. A cada poço da placa de fundo U foi misturado 50 μ L de glicerol estéril 70% e em seguida congelado a - 80 °C, para conservação da biblioteca do 16S rRNA.

O restante do crescimento celular presente nos blocos foi utilizado na preparação de plasmídeo em microplacas. O bloco com as células foi selado com adesivo e centrifugado por 6 minutos a 1.500 g para sedimentação celular. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a cada poço do bloco foi adicionado 240 μ L do meio GET, em seguida o bloco foi selado com adesivo e agitado no vortex até completa homogeneização. A solução homogeneizada foi transferida para uma placa de fundo U que foi selada com adesivo e centrifugada por 10 minutos a 1.500 g em temperatura ambiente até a completa sedimentação das células. O adesivo foi retirado da placa e em seguida o sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente por 3 minutos.

A cada poço da placa de fundo U foram adicionados 80 μ L de GET com RNase. A placa foi selada com adesivo e agitada em vortex para ressuspensão das células. Logo após, o adesivo foi removido e adicionado a cada poço 80 μ L de NaOH 0,2N/ SDS 1%. A placa foi selada com um adesivo novamente e misturada 30 vezes por inversão. Após a inversão a placa

foi mantida por 5 minutos a temperatura ambiente até a retirada de toda solução do adesivo e quando necessário se submeteu a placa a uma leve centrifugação, favorecendo o processo. Passado esse tempo o adesivo foi removido e adicionou-se a cada poço 80 µL de acetato de potássio 3M. A placa foi selada novamente com adesivo e misturada 30 vezes por inversão sendo então estocada por 10 minutos no gelo. Em seguida, a placa foi colocada na centrífuga e dado um pulso até chegar a 1.500 g. Logo após, o adesivo foi removido da placa e a mesma foi incubada aberta em estufa a 90 °C por 30 minutos.

Após os 30 minutos, a placa foi selada com adesivo e resfriada em gelo picado por 10 minutos. Em seguida a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1.500 g e 20 °C e todo o volume do sobrenadante presente na placa de fundo U foi transferido para uma placa Millipore presa a uma placa de fundo V. As placas foram centrifugadas por 5 min a 1.500 g e 20 °C até todo volume descer da placa Millipore para a placa de fundo V. A placa Millipore atuou na filtração do sobredanante para a placa de fundo V.

A placa Millipore foi descartada ficando apenas a placa de fundo V. Foi adicionado ao filtrado presente na placa de fundo V 100 µL de Isopropanol. A placa foi selada com adesivo e misturada 30 vezes por inversão e então centrifugada por 45 minutos a 1.500 g e 20 °C. O adesivo foi removido e o sobrenadante descartado e a cada poço foi adicionado 200 µL de Etanol 70 % gelado. Em seguida a placa foi selada novamente e centrifugada por 5 minutos a 1.500 g e 20 °C. O sobrenadante foi removido e a placa invertida em papel absorvente na centrífuga e submetida a uma leve centrifugação por 3 segundos. A placa foi seca em TA por 60 minutos e o DNA ressuspendido com 100 µL de água MilliQ. Os clones foram confirmados através da PCR de plasmídeos com os iniciadores M 13F (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3') e M 13R (5'AGCGGATAACAATTTCA CACACAGG 3').

3.9 – Sequenciamento

Os clones foram seqüenciados pela a empresa Macrogen, onde foi realizado o sequenciamento por meio do seqüenciador ABI 3730 (www.Macrogen.com). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye TM – ABI PRISM, seguindo as instruções do fabricante.

3.10 – Análises das sequências

Para a visualização dos eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foi utilizado o programa Bioedit Sequence alignment Editor (HALL, 1999). As sequências com configuração padrão foram rodadas no Ribossomal Database Project (RDP) (website <http://www.rdp.cme.msu.edu>) para se obter sequências desprovidas do vetor e com qualidade acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). Após as sequências terem passado pelo RDP foram alinhadas no programa Clustal X2 (CHENNA *et al.*, 2007). As sequências acima de 300 nucleotídeos foram selecionadas para a análise do programa DOTUR. Este programa foi utilizado no cálculo do índice de diversidade de Shannon–Wiener, índice de equitatividade e curva de rarefação. Em todas as análises foi considerada uma distância que mostrasse os resultados em nível de espécie, com distância de 0.03% (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004). A similaridade entre as sequências foi obtida por meio do Blast (NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4 – RESULTADOS

4.1 – Identificação das Colônias de Ascídias

Ordem ENTEROGONA Perrier, 1898

Subordem APLOUSOBRANCHIA Lahille, 1887

Família Didemnidae Verrill, 1871

Gênero *Didemnum* Savigny, 1816

4.1.1 – *Didemnum galacteum* Lotufo & Dias, 2007

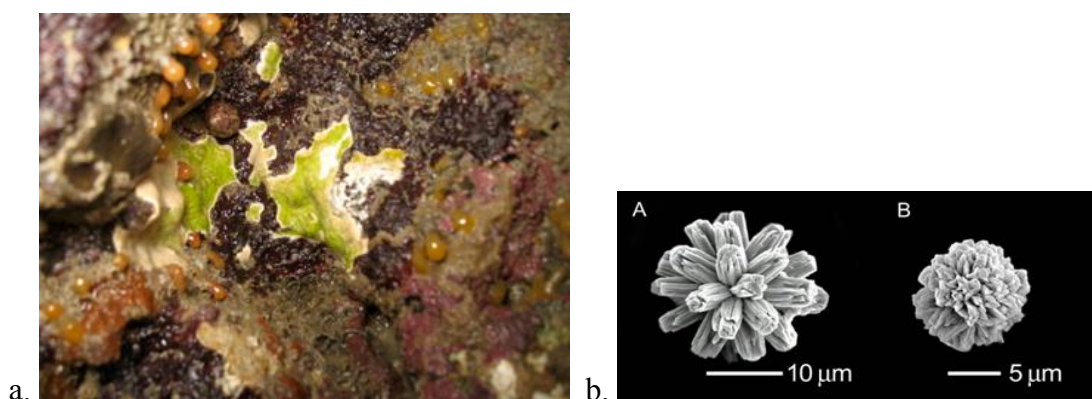


Figura 8 – Em (a): Aspecto externo da ascídia colonial *Didemnum galacteum*; em (b) Espículas de *D. galacteum*. Fotos: (a) Acervo pessoal, (b) Lotufo e Dias (2007).

Colônias incrustantes com espessura média de 2,0 mm. Coloração esbranquiçada, característica da grande concentração de espículas, podendo em algumas colônias formar um biofilme esverdeado devido à presença de algas simbiotes sobre a túnica (Figura 8a). As espículas são pequenas, esféricas com vários raios curtos e cônicos (Figura 8b), presentes por toda túnica, o que praticamente impossibilita a visualização dos zoóides. Os zoóides (ou propriamente indivíduos) são bastante pequenos medindo pouco mais de 1mm, característico dos dideminídeos. O corpo é dividido em tórax, onde estão presentes dois sifões e a cesta branquial, e abdômen, local que abriga órgãos digestórios e reprodutivos. Detalhes das características de *D. galacteum* foram descritas por Lotufo e Dias (2007) comprovando-a como uma nova espécie para o litoral brasileiro.

Distribuição: Atlântico Tropical Americano

Família Polycitoridae Michaelsen, 1904 sensu Kott, 1990

Gênero *Cystodytes* Drasche, 1884

4.1.2 – *Cystodytes* sp.



a.

Figura 9 – Aspecto externo de *Cystodytes* sp. (Acervo pessoal)

Colônias incrustantes com espessura média de 5 mm, túnica lisa de textura carnosa. Coloração branco-acinzentada, podendo variar entre as colônias, e em algumas foi possível visualizar a formação de um biofilme esverdeado de algas simbiotes (Figura 9). Poucas espículas, estando concentradas ao redor do zoóide, principalmente na região do abdômen. Zoóides com tamanho médio de 2 mm, e corpo dividido em tórax e abdômen. Algumas características divergem em relação às descrições que poderiam identificá-la como *Cystodytes dellechiajei* Della Valle (1887), sendo diferenças de coloração e formato de espículas. Esse aspecto foi evidenciado durante as descrições de Lotufo (2002) para espécimes coletados no litoral nordestino.

Distribuição: Mares tropicais e temperados

4.2 – Análise morfológica do biofilme da superfície da túnica das ascídias

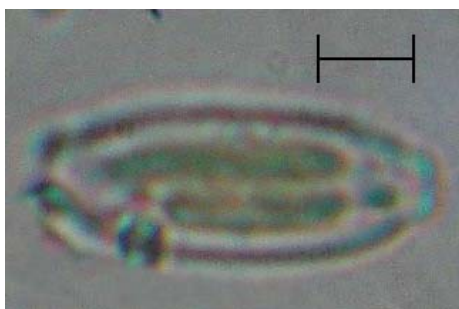
O estudo do biofilme da superfície da túnica das duas ascídias analisadas mostrou uma microbiota com representantes do grupo das diatomáceas e cianobactéria (Tabela 1). Abaixo estão descritos alguns dos componentes encontrados.

Tabela 1 – Gêneros de cianobactérias e diatomáceas observadas no biofilme analisado da superfície externa das ascídias por meio de microscopia ótica.

Microbiota do Biofilme	Ascídia <i>D.galacteum</i>	Ascídia <i>Cystodytes</i> sp.
<i>Amphora</i>	X	X
<i>Nitzschia</i>	X	
<i>Bacillariophyceae 1</i>	X	
<i>Bacillariophyceae 2</i>		X
<i>Cylindrotheca</i>		X
<i>Prochloron</i>	X	X

Divisão BACILLARIOPHYTA
 Classe BACILLARIOPHYCEAE
 Ordem THALASSIOPHYSALES
 Família CATENULACEAE

Amphora Ehrenberg ex Kützing 1844



Frústulas solitárias, semi-elípticas, com extremidades truncadas. Eixo apical: 20,7 μm ; eixo transapical: 8,1 μm .

Habitat: as espécies pertencentes a esse gênero podem ser epífitas, epilíticas ou epipélicas. Gênero bem representado no ambientes marinho, com poucas espécies dulciaquícolas (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990).

Figura 10– *Amphora* sp. vista pleural (Acervo pessoal)

Divisão BACILLARIOPHYTA
 Classe BACILLARIOPHYCEAE
 Ordem BACILLARIALES
 Família BACILLARIACEAE

Nitzschia Hassall, 1845



Frústula solitária, linear-lanceoladas com dois cloroplastos, um em cada pólo da célula. Eixo apical: 39,6 μm ; eixo transapical: 6,8 μm

Habitat: Gênero marinho ou dulciaquícola, com espécies epipélicas ou planctônicas.

Figura 11 – *Nitzschia* sp.
 vista valvar (Acervo pessoal).

Divisão BACILLARIOPHYTA
 Classe BACILLARIOPHYCEAE

Bacillariophyceae 1



Frústula solitária. Eixo apical 44,3 μm ; eixo transapical 12,5 μm .

Figura 12 – Bacillariophyceae 1 (Acervo pessoal)

Divisão BACILLARIOPHYTA
 Classe BACILLARIOPHYCEAE
 Ordem BACILLARIALLES
 Família BACILLARIACEAE

Cylindrotheca Rabenhorst, 1859



Células solitárias, centro lanceolado, ápices retorcidos e afilados em forma de agulha; dois cloroplastos na parte central da célula, um em cada extremidade apical; eixo apical 55,5 μm , eixo transapical 3,6 μm .

Comentários: este é um gênero que possui poucas espécies distribuídas no epipelon de ambientes marinhos e raramente ocorrem em ambientes dulciaquícolas (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990).

Cylindrotheca closterium é uma espécie frequentemente encontrada em estuários cearenses (BARROSO, 2010).

Figura 13 – *Cylindrotheca* (Acervo pessoal)

Divisão BACILLARIOPHYTA
 Classe BACILLARIOPHYCEAE

Bacillariophyceae 2



Frústula solitária. Eixo apical 52,9 μm ; eixo transapical 7,7 μm .

Figura 14 – Bacillariophyceae 2 (Acervo pessoal)

Divisão CYANOPHYTA
Classe CYANOPHYCEAE
Sub–Classe PROCHLOROPHYTA

Prochloron Lewin, 1975

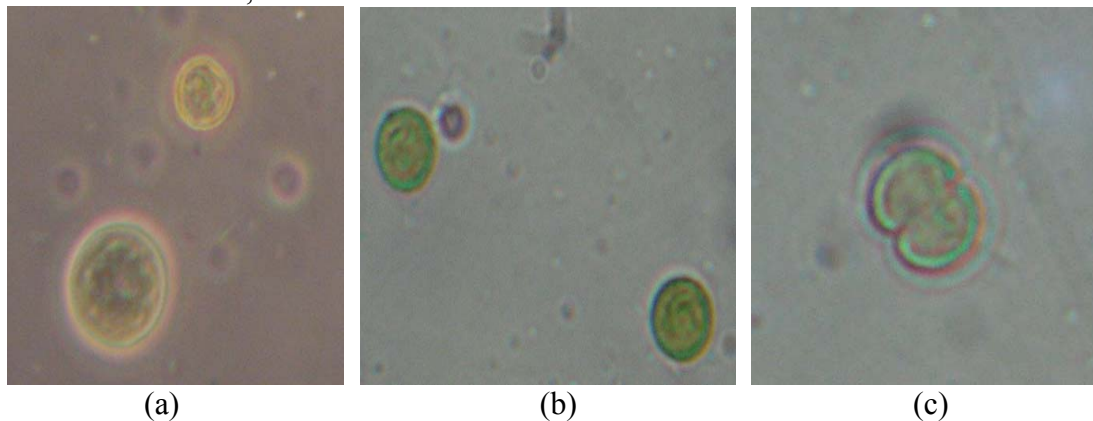


Figura 15 – Variação da forma, em (a) Células diferentes quanto ao tamanho, (b) Células mesma dimensão e em (c) Células se dividindo por fissão binária (Acervo pessoal).

Células unicelulares, solitárias, cocóides, medindo de 12 μm a 18 μm . Hábitat: As *Prochloron* são exclusivamente marinhas, estas células são simbioses de ascídias tropicais e subtropicais (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

4.3 – Análise das bandas determinadas por DGGE (Eletroforese Gel Gradiente de Desnaturação)

A análise do gel permitiu a visualização de bandas múltiplas para as amostras analisadas, caracterizando o perfil de diversidade da comunidade microbiana presente nas amostras obtidas por DGGE (Figura 16).

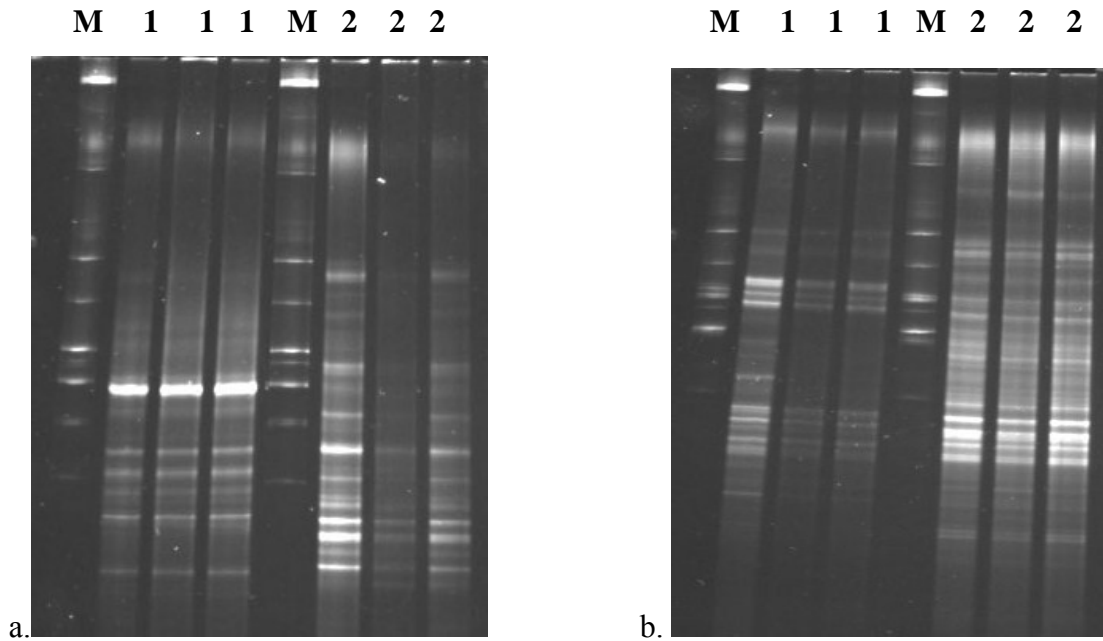
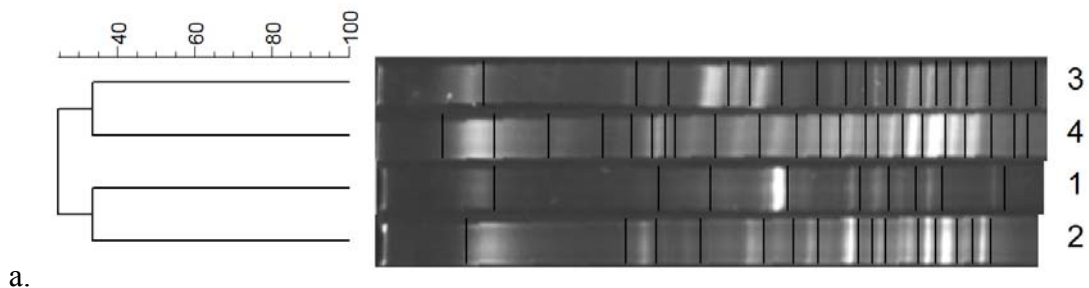
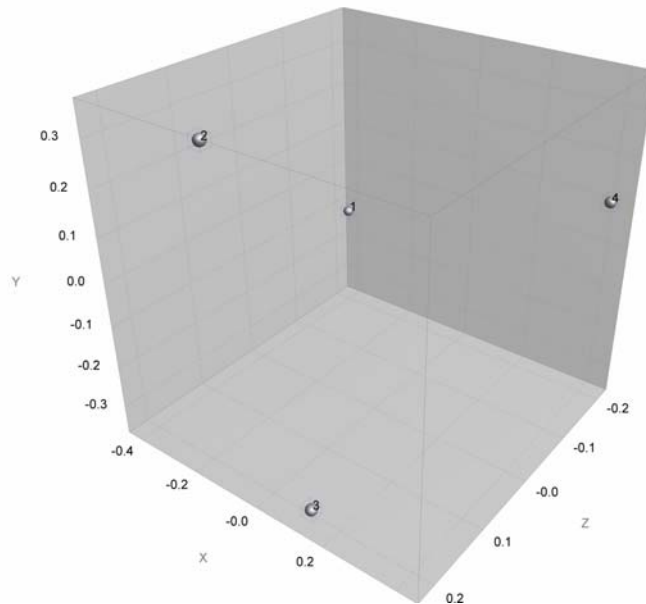


Figura 16 – Fotografia dos géis em triplicata – M –marcador 1 Kb. 1a) microbiota da superfície da túnica de *Cystodytes* sp.; 2a) microbiota da água do mar (Pecém); 1b) microbiota da superfície de *Didemnum galacteum*; 2b) microbiota da água do mar (Praia dos Dois Coqueiros).

A similaridade entre as amostras foi em torno de 40% e pode ser evidenciada na (Figura 17a).



Os dados de presença e ausência de bandas foram utilizados numa análise de escalonamento multidimensional (NMDS) (Figura 17b).



b.

Figura 17 – Em (a): Agrupamento hierárquico com base na distância de Jaccard e no algoritmo UPGMA para a comunidade de bactérias da superfície da túnica e da microbiota da água do mar onde as amostras foram coletadas; 1- Superfície da túnica de *Cystodytes* sp (Pecém), 2- Água do mar (Pecém), 3- Água do mar (Praia dos Dois Coqueiros) e 4- Superfície da túnica de *Didemnum galacteum* (Praia dos Dois Coqueiros); em (b): Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para as quatro amostras.

Esta técnica permite a visualização por meio gráfico em duas ou três dimensões, evidenciando a proximidade entre os objetos. As amostras 1 e 2 (Pecém) foram mais próximas, indicando maior similaridade do que as amostras 3 e 4 (Dois Coqueiros). Cada banda evidenciada no gel representa o número de UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) em cada amostra. O maior número UTOs foi localizado na amostra da microbiota da água do mar na praia dos Dois Coqueiros (22), seguido da microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum* (18), microbiota da água do mar do porto do Pecém (15) e por fim, microbiota da superfície da túnica de *Cystodytes* sp. (9) (Figura 18).

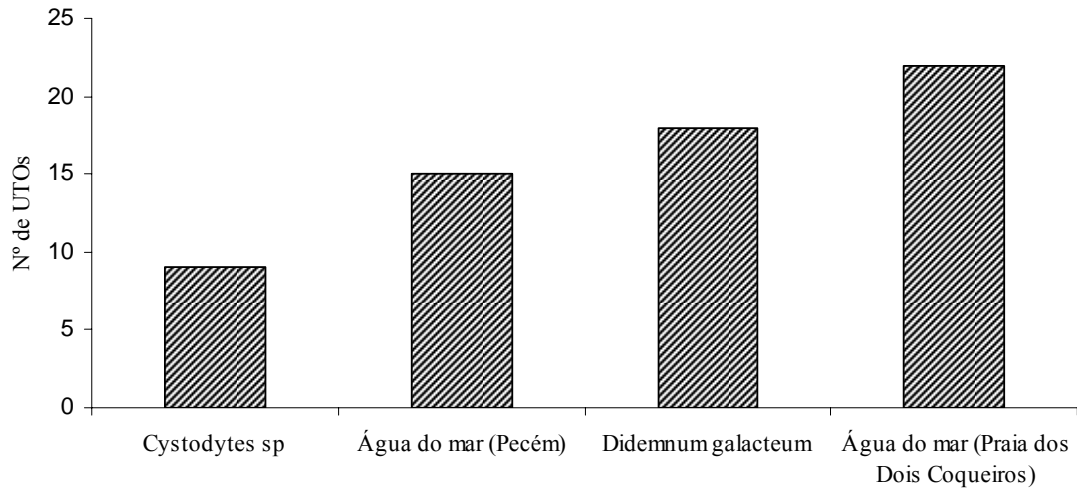


Figura 18 – Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs)

Para uma melhor visualização dos resultados das UTOs obtidas, foi confeccionado o diagrama de Venn, que permitiu a observação do padrão de UTOs compartilhadas e exclusivas das amostras (Figura 19). A análise por meio do diagrama evidenciou que apesar de uma grande parte das UTOs serem compartilhadas entre as amostras, esse número não difere na comparação com as UTOs exclusivas das duas amostras da água do mar.

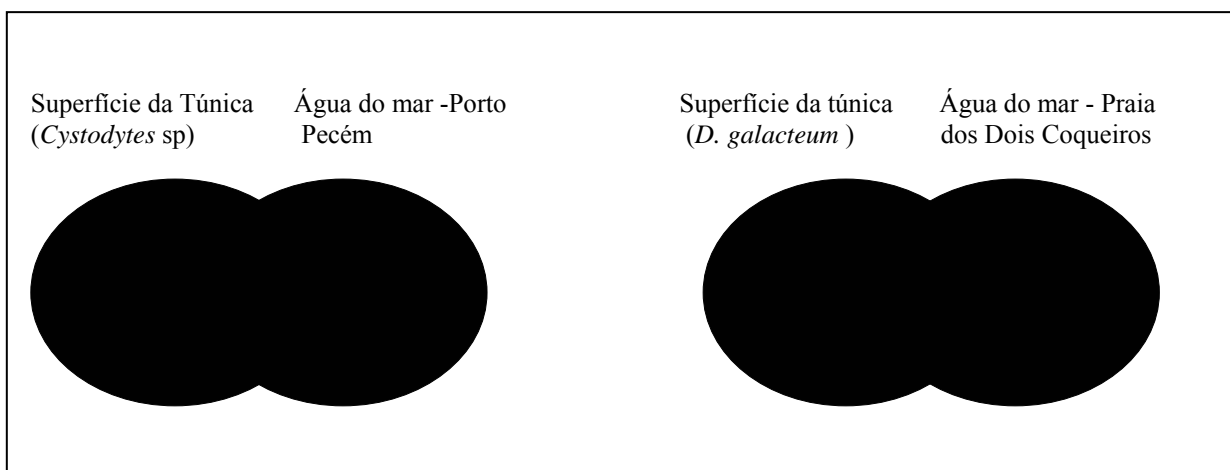


Figura 19 – Diagrama de Venn, UTOs compartilhadas e exclusivas entre as amostras

Os dados de diversidade de Shannon – Wiener mostraram que a microbiota mais diversa foi a da água do mar (Praia dos Dois Coqueiros), seguida da microbiota da superfície da ascídia *Didemnum galacteum*, microbiota da água (Pecém) e *Cystodytes* sp. O índice de equitatividade de Pielou (J') mostrou a distribuição das UTOs para cada amostra, contudo não houve uma diferença na comparação dos valores obtidos, indicando não haver uma dominância de UTOs em cada amostra analisada (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores do índice de Shannon/Wierner (H') e índice de equitatividade de Pielou (J') para os dois locais: Praia dos Dois Coqueiros (microbiota da superfície de *D. galacteum* e da água do mar), Pecém (microbiota da superfície de *Cystodytes* sp. e água do mar).

Amostras	N	H'(loge)	J'
Microbiota da água do mar (Pecém)	1822	2,706	0,9991
Microbiota da superfície da túnica de <i>Cystodytes</i> sp. (Pecém)	1285	2,196	0,9994
Microbiota da água do mar (Praia dos Dois Coqueiros)	2395	3,114	0,9930
Microbiota da superfície da túnica de <i>D. galacteum</i> (Praia dos Dois Coqueiros)	1277	2,855	0,9878

4.4 – Clonagem e sequenciamento

Duas bibliotecas do 16S rDNA foram construídas, uma para a microbiota da superfície da túnica da ascídia *Didemnum galacteum* e a outra para a microbiota da superfície da túnica de *Cystodytes* sp. Um total de 192 clones foram sequenciados, 96 para cada amostra. De acordo com os critérios estabelecidos na metodologia, 89 clones foram utilizados nas análises da microbiota da ascídia *Didemnum galacteum* e 68 clones para a ascídia *Cystodytes* sp. (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de clones e UTOs para a microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp.

Amostras	Número de clones	Número de UTOs
<i>Didemnum galacteum</i>	89	62
<i>Cystodytes</i> sp.	68	11

As análises das sequências permitiram a identificação dos simbiontes ao nível de espécie, onde a similaridade exigida é de 97%. Mas uma vez, corroborando com os dados obtidos na análise do DGGE para a superfície da túnica do hospedeiro, a microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum* se mostrou mais diversa em relação a microbiota da superfície da túnica de *Cystodytes* sp. (Tabela 4).

Tabela 4 – Diversidade da microbiota associada a superfície da túnica de ascídias hospedeiras

Hospedeira	Shannon
<i>Didemnum galacteum</i>	3.95336
<i>Cystodytes</i> sp.	1.38009

A comunidade microbiana analisada pela biblioteca do 16S rRNA revelou a dominância de bactérias nas duas bibliotecas. Dentre as bactérias o táxon dominante em todos os casos foi Proteobacteria, com 62% dos clones representado por Alphaproteobacteria para a microbiota da ascídia *Didemnum galacteum* enquanto para a microbiota de *Cystodytes* sp., o maior representante foi Gammaproteobacteria com 90% dos clones (Figuras 20a e 20b). Outros representantes de Proteobacteria como organismos não cultiváveis e Betaproteobacteria também compunham a diversidade.

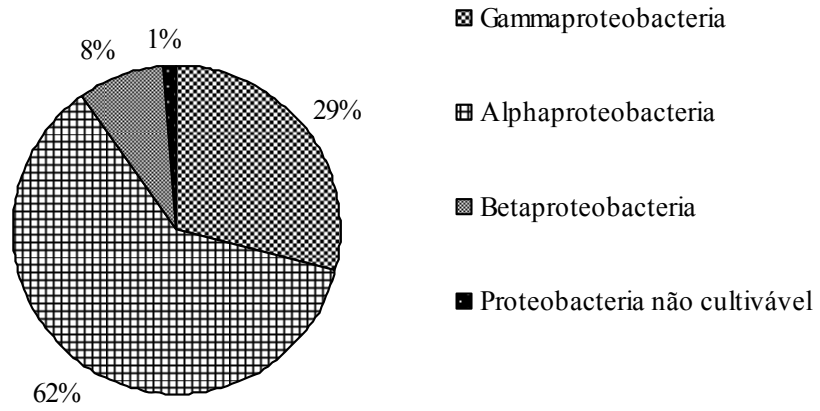
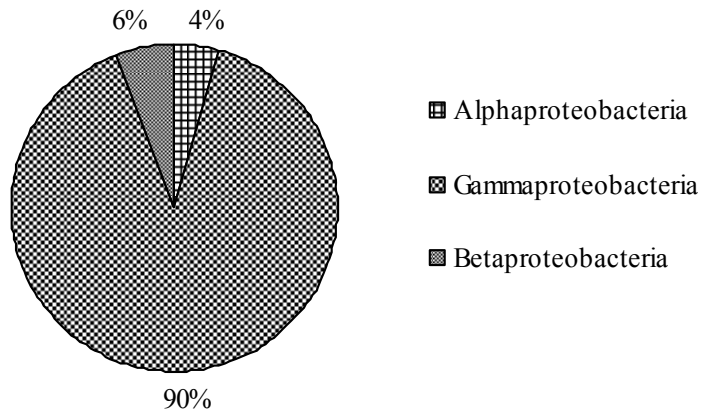
Proteobacteria - *D. galacteum*Proteobacteria - *Cystodytes* sp.

Figura 20 – Dominância dos táxons de Proteobacteria para cada amostra. Em (a): microbiota da ascídia *D. galacteum*; em (b) microbiota da ascídia *Cystodytes* sp.

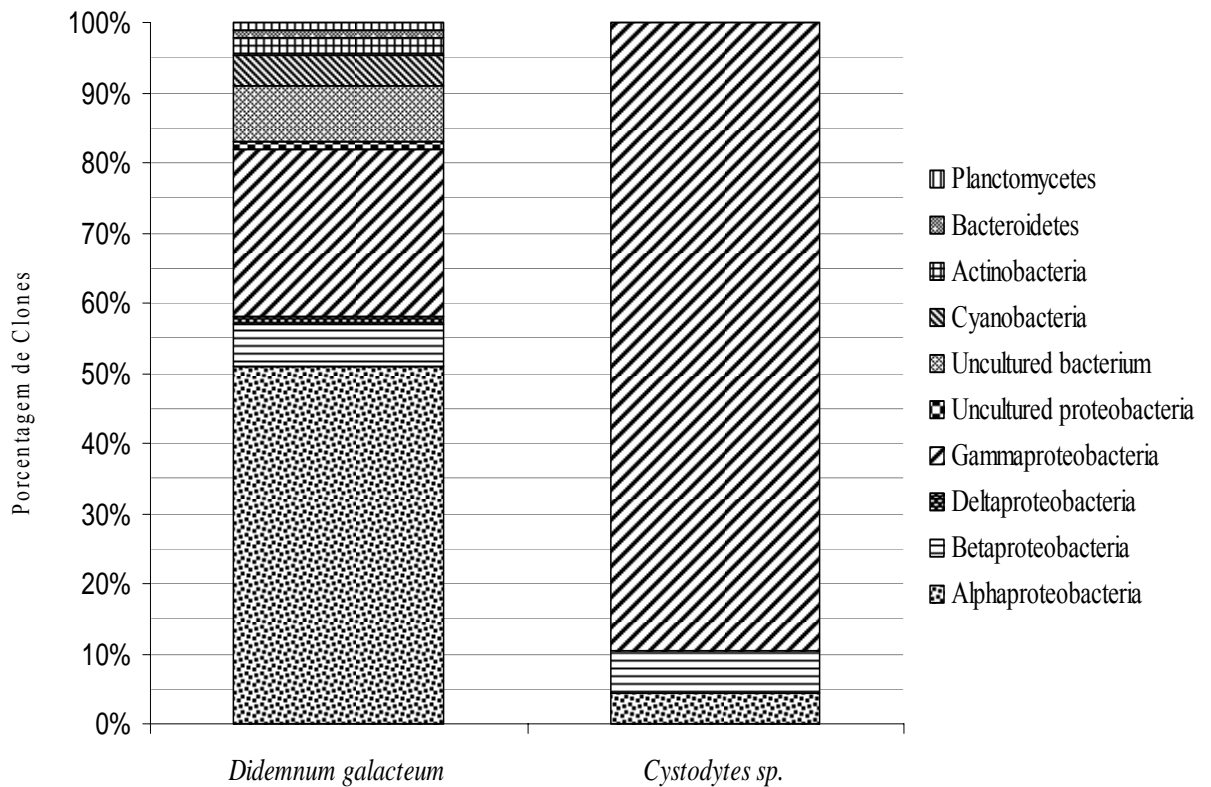


Figura 21 – Diversidade dos clones da microbiota da superfície da túnica *Didemnum galacteum* e *Cystodytes sp.*

Outros representantes como Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Cyanobacteria e Bactérias não cultiváveis foram evidenciadas na microbiota de *Didemnum galacteum*, porém em menor proporção (Figura 21).

A curva de rarefação foi utilizada para se conhecer a cobertura dos clones em cada amostra. De acordo com os dados obtidos, tanto as curvas da amostra da microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum*, como *Cystodytes sp* não indicam uma curva estável, o que caracteriza que não houve uma cobertura da diversidade, pois a curva tende a um aclave (Figuras 22 e 23).

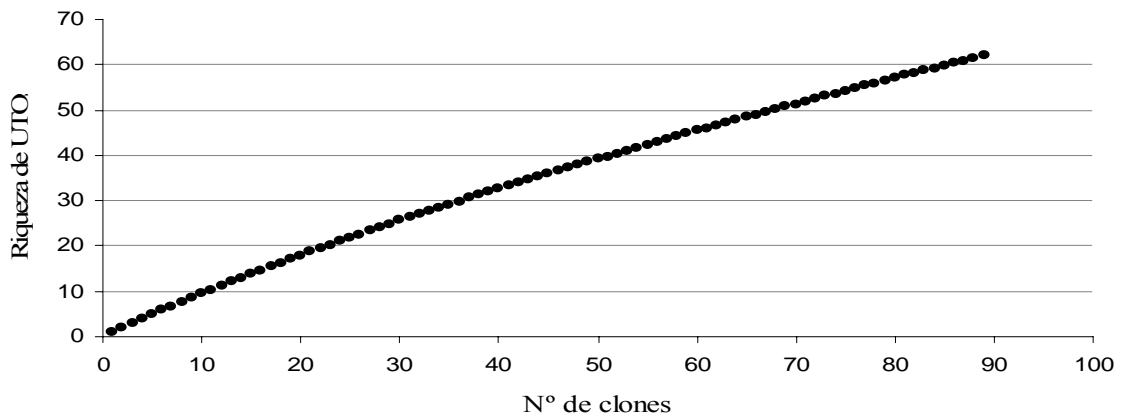


Figura 22 – Curva de rarefação para a microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum*

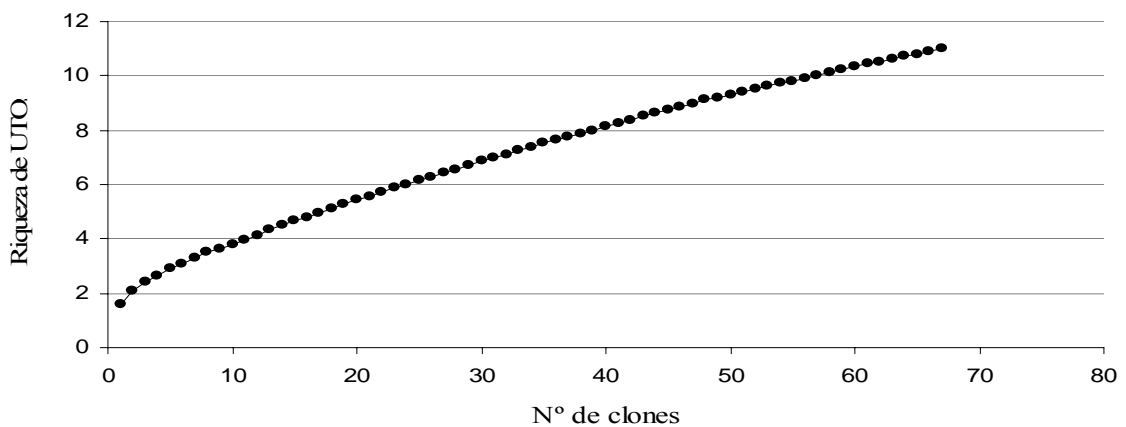


Figura 23 – Curva de rarefação para a microbiota da superfície da túnica de *Cystodytes* sp.

O índice de equitatividade permitiu a visualização de distribuição das sequências nas UTOs. Para a *Didemnum galacteum*, este dado foi bem representado, com o número de sequências dividido entre as UTOs, não tendo um grupo dominante específico (Figura 24). Para *Cystodytes* sp. o índice mostrou dois UTOs dominantes, 1 UTO com 36 sequências e outra com 20 sequências, ficando o restante das UTOs com apenas 1 sequência (Figura 25).

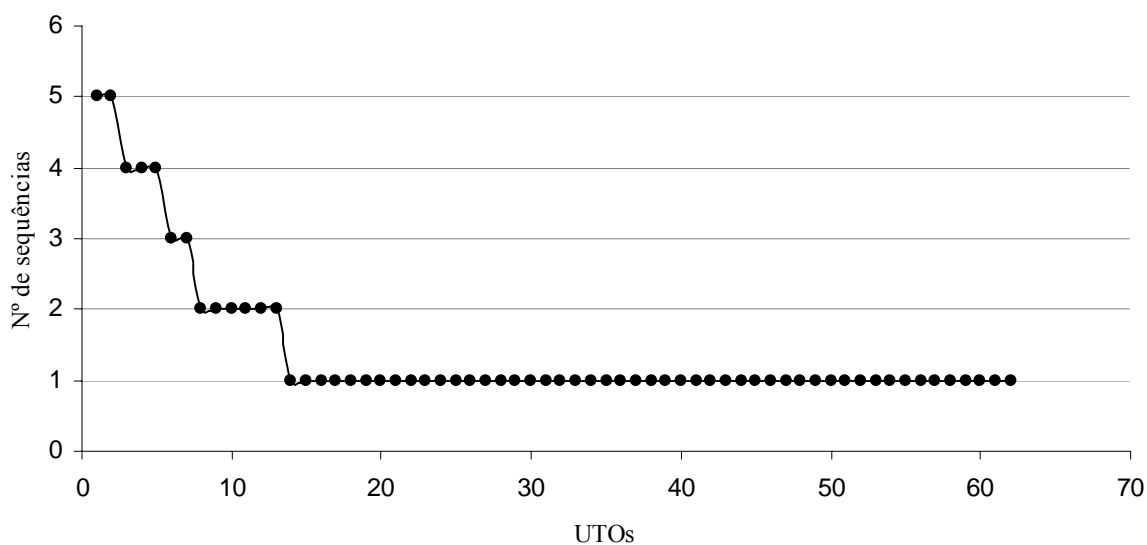


Figura 24 – Índice de equitatividade para o número de UTOs de *Didemnum galacteum*.

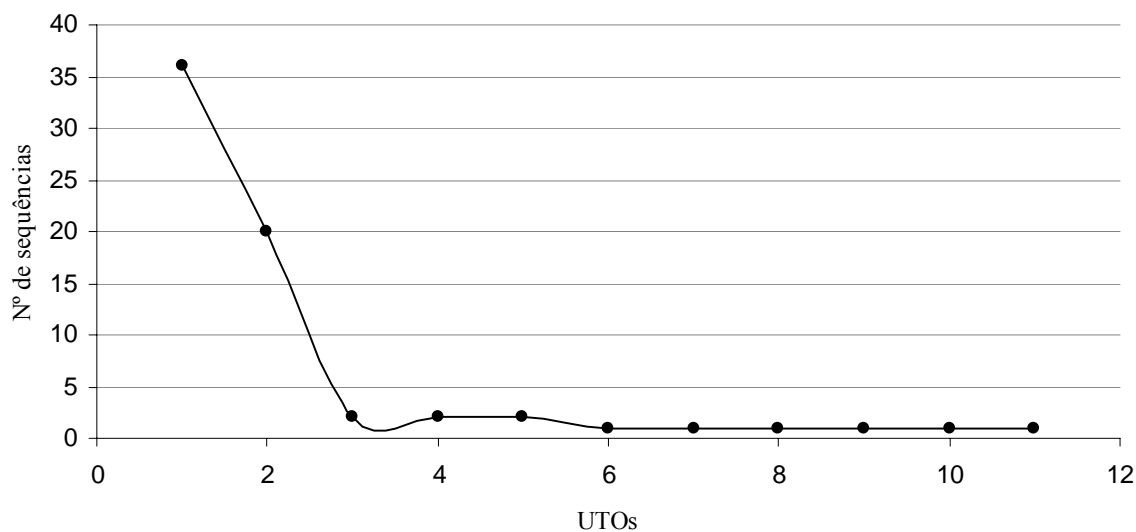


Figura 25 – Índice de equitatividade para o número de UTOs de *Cystodytes sp.*

As seqüências obtidas nesta presente pesquisa foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank. Dados como a classificação, o número de acesso e similaridade das seqüências foram utilizados na confecção de tabelas para uma melhor compreensão dos resultados (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Tabela de classificação das sequências do 16S rDNA, obtidas por meio de comparação dos dados do GenBank, para a superfície da túnica de *Didemnum galacteum*.

Classificação	Dados GenBank	Número de Sequências em UTOs	Similaridade %
α - proteobacteria	alpha proteobacterium clone I IleuAB2_10(AJ890097)	4	97
α - proteobacteria	Uncultured Sinorhizobium sp. clone BME107(DQ917806)	4	99
γ -proteobacteria	Uncultured gamma proteobacterium clone TH1-35(AM690836)	5	99
	Uncultured bacterium clone 2FSeds_C12(GQ412928)	1	98
α - proteobacteria	Rhizobium sp.KT 605(GU459174)	1	100
	Uncultured bacterium clone: SSmCB03-46(AB176353)	1	98
α - proteobacteria	Achromobacter sp. EP17(AM398226)	2	99
α - proteobacteria	Uncultured Paracoccus sp. clone SIMO-4403(DQ421768)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone F1_103(EF123411)	2	99
δ -proteobacteria	Uncultured delta proteobacterium clone Belgica2005/10-ZG-2(DQ351798)	1	98
Cyanobacteria	Stigonema ocellatum SAG 48.90(AJ544082)	1	96
	Uncultured bacterium clone PC-FL12-32(EF379909)	1	99

Classificação	Dados GenBank	Número de Sequências em UTOs	Similaridade %
γ -proteobacteria	Rhodopseudomonas sp. HMD89(AB079679)	3	98
β - proteobacteria	Burkholderia fungorum KN-19(AB091191)	1	99
	Uncultured bacterium clone S25_601(EF574257)	1	98
Actinobacteria	Uncultured actinobacterium clone CB11D04(EF471579)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone L13(DQ860071)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone CD204B07(DQ200416)	1	97
α - proteobacteria	Alpha proteobacterium B1 ZZ-2008(FM180515)	1	99
	Uncultured bacterium clone StromH08(EU918027)	1	87
	Uncultured bacterium Niigata-09(AB243820)	1	99
β - proteobacteria	Cupriavidus sp. AP1(2010)(GU566329)	1	99
γ -proteobacteria	Microbulbifer cystodytense(AJ620879)	1	96
γ -proteobacteria	Pseudomonas sp. ECU1011(GQ246949)	3	99
γ -proteobacteria	Stenotrophomonas maltophilia LMG 10989(AJ131907)	5	98
	Uncultured bacterium clone B8S- 123(EU652520)	1	99
	Uncultured bacterium clone 3-35(DQ494529)	1	86
α - proteobacteria	Alpha proteobacterium Z143-1(AY62960)	1	99
γ -proteobacteria	Uncultured gamma proteobacterium clone VHS-B3-55(DQ394949)	1	95
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone L13(DQ860071)	1	97

Classificação	Dados GenBank	Número de Sequências em UTOs	Similaridade %
	Uncultured bacterium clone 44(EU883378)	2	98
	Uncultured bacterium clone SGUS1024(FJ202534)	1	97
α - proteobacteria	Uncultured Hyphomicrobium sp. clone 037_D10_06-0174356(FJ654635)	1	98
Cyanobacteria	Synechococcus sp. BE0807L(FJ63778)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone 3B02-43(DQ431900)	1	99
	Uncultured bacterium DSSF66(AY328688)	1	98
δ -proteobacteria	Uncultured delta proteobacterium clone WA_26f(EF123489)	1	99
	Uncultured bacterium clone SGUS737(FJ202909)	1	98
	Uncultured bacterium clone Crozet_s808(FM214289)	1	95
	Uncultured bacterium clone m35(AY444983)	1	99
Actinobacteria	Acinetobacter sp. NR4(2010)(GU566324)	1	99
γ -proteobacteria	Citrobacter freundii strain BRN2(DQ517286)	1	99
	Uncultured bacterium clone 1-8B(EU289456)	1	97
Bacteroidetes	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone A28(GQ249492)	1	99
Planctomycetes	Uncultured Planctomycetales bacterium clone EC82(DQ889908)	1	90

Classificação	Dados GenBank	Número de Sequências em UTOs	Similaridade %
γ -proteobacteria	Pseudomonas sp. 8042(AM111077)	1	99
γ -proteobacteria	Uncultured gamma proteobacterium clone TSN70(EU302879)	1	92
α - proteobacteria	Stappia alba 5OM30(AJ889010)	1	98
	Uncultured bacterium clone Crozet_s_210(FM213691 .1)	1	96
α - proteobacteria	Uncultured Rhodobacterales clone: pItb-vmat-83(AB294975)	1	99
	Uncultured bacterium clone Crozet_s1157(FM214638)	1	94
α - proteobacteria	Uncultured Achromobacter sp. clone CHINA46(GU563751)	1	99
α - proteobacteria	Alpha proteobacterium NW4327(AF384141)	1	97
Cyanobacteria	Symploca sp. VP642c(AY032934)	1	96
Actinobacteria	Uncultured Acinetobacter sp. clone GI5-006-G06(FJ192939)	1	99
α - proteobacteria	Rhizobium loti(RLU50165)	2	99
Actinobacteria	Uncultured actinobacterium clone Nubeena299(AY500123)	1	97
Cyanobacteria	Uncultured Cyanobium sp. clone EC49(DQ889923)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured alpha proteobacterium clone BBD216b38(EF123436)	1	98
	Uncultured bacterium clone p26n21ok(FJ478565)	2	99
	Uncultured bacterium clone Crozet_s790(FM214271)	1	94

Tabela 6 – Tabela de classificação das sequências do 16S rDNA, obtidas por meio de comparação dos dados do GenBank, para a superfície da túnica de *Cystodytes* sp.

Classificação	Dados GenBank	Número de Sequências em UTOs	Similaridade %
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 17390 (AF094737)	36	98
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. NAR11 (AB453292)	20	99
	Uncultured bacterium clone (EF409260)	2	99
α - proteobacteria	<i>Achromobacter</i> sp. EP17 (AM398226)	2	99
β - proteobacteria	<i>Alcaligenes</i> sp. (AJ002804)	1	100
γ -proteobacteria	<i>Vibrio rumoiensis</i> strain EHR2 (DQ530289)	2	99
α - proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp. R-32539 (AM691584)	1	100
β - proteobacteria	Uncultured bacterium clone TF181 (GU272268)	1	100
α - proteobacteria	Alpha proteobacterium PI_GH4.1.G4 (AY162053)	1	99
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. R-24636 (AM083997)	1	99
α - proteobacteria	Uncultured bacterium clone Sd1-26 (GQ246307)	1	99

5 – DISCUSSÃO

A aplicação de técnicas combinadas no estudo de uma comunidade microbiana pode trazer resultados surpreendentes. O presente trabalho, com o uso da microscopia ótica e técnicas moleculares, como DGGE e análise da biblioteca do 16S rRNA, evidenciou uma complexa comunidade microbiana associada à superfície das ascídias *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp. A microbiota associada a estas colônias de ascídias foi representada por bactérias, cianobactérias e diatomáceas. Martinez–Garcia *et al.* (2007), ao avaliarem a microbiota da ascídia *Cystodytes dellechiaiei* usando diferentes técnicas também observaram uma comunidade diversa, composta por bactérias, algas filamentosas e diatomáceas.

As observações da microscopia ótica revelaram a presença de diatomáceas epífitas e de cianobactérias do gênero *Prochloron*, sendo estas últimas comumente encontradas associadas às ascídias da família Didemnidae e Polycitoridae em uma associação que pode ser obrigatória ou não.

Segundo Cox (1986) a cianobactéria do gênero *Prochloron* pode habitar três locais distintos em uma ascídia: cavidade cloacal, matriz da túnica e superfície externa da túnica, nunca estando a incubação em mais de uma estrutura. Ainda segundo esse autor, quando a incubação é na cavidade cloacal e matriz da túnica a simbiose é dita obrigatória, enquanto sua presença na superfície externa da túnica indica uma simbiose não obrigatória. Os resultados da presente pesquisa evidenciaram simbiose não obrigatória, uma vez que os simbiontes estavam na superfície externa da túnica. Apoiando este fato também deve-se levar em consideração as observações feitas em campo, pois muitas colônias da mesma espécie não apresentam este biofilme.

Nenhum trabalho até o momento havia revelado a presença de diatomácea coexistindo com esta cianobactéria em uma mesma ascídia, sendo este o primeiro registro. Muitos trabalhos relataram a exclusividade desta interação ou a coexistência com outras algas e cianobactérias. Hirose, Hirose e Neilan (2006) evidenciaram a espécie de ascídia *Trididemnum miniatum* abrigando exclusivamente a *Prochloron*. Hirose, Uchida e Murakami (2009) realizaram um estudo com a ascídia *Trididemnum clinides* e ao analisarem a microbiota da sua túnica eles ressaltaram a presença de dois tipos de cianobactérias, uma filamentosa e outra cocóide coexistindo com a cianobactéria *Prochloron*. Outros estudos também, comprovam a presença de outras cianobactérias simbiontes em ascídias que abrigam

a cianobactéria *Prochloron* (KOTT, 1984; KOTT; PARRY; COX, 1984). Então os resultados sugerem que possa haver um novo tipo de interação.

Para Pinto-Coelho (2000), simbiose é a interação entre espécies que vivem juntas. A simbiose das ascídias com a cianobactéria *Prochloron* é de mutualismo ou protocooperação onde as duas espécies se beneficiam, diferenciando uma relação da outra apenas pela obrigatoriedade, enquanto que para diatomáceas epífitas, a simbiose é conhecida como comensalismo, onde apenas uma espécie é beneficiada.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram diferentes gêneros de diatomáceas compondo a microbiota da superfície externa das ascídias *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp. Segundo Cupp (1943) as diatomáceas são largamente distribuídas na natureza, com espécies presentes em ambientes pelágicos e zonas litorâneas próximas à costa, podendo estas ter hábito planctônico ou viverem fixas ao substrato. Quando aderidas ao substrato, as diatomáceas formam o perifíton, e de acordo com o tipo deste substrato elas podem se classificar em: epífitas (sobre macrófitas aquáticas), epilíticas (sobre pedras e rochas) e epizoóica (sobre a superfície de animais) (SUTHERLAND, 2008; TOTTI *et al.*, 2005). Estes grupos de diatomáceas são caracterizados por possuir uma boa adesão ao substrato no qual podem fixar, favorecendo assim sua presença em locais com forte hidrodinamismo (COSTA, 2008).

Diferentes trabalhos têm apontado o crescimento de diatomáceas sobre a superfície de invertebrados como esponjas e ascídias ou fazendo parte da dieta alimentar destes organismos (CERRANO *et al.*, 2004; LAMBERT, 1968; RIBES; CIMA; GILI, 1998). Não se sabe ao certo qual o tipo de simbiose e quais os benefícios ou malefícios que esta interação poderia trazer ao hospedeiro. Porém, Lambert (1968) considerou este tipo de associação para a ascídia solitária *Corella willmeriana* como negativa, pois foi visto que as ascídias expostas mais intensamente à alta luminosidade possuíam biofilmes no sifão atrial e cesta branquial devido ao rápido crescimento, o que sufoca as ascídias levando-as a morte, diferentemente das ascídias que habitavam locais sombreados que conseguiram sobreviver mesmo com o crescimento das diatomáceas.

Para Bingham e Reys (1999), em estudo realizado com a ascídia solitária *Corella inflata*, o que estaria levando as ascídias à morte não é a presença de diatomáceas crescendo sobre as mesmas em locais expostos à luz. O que provocaria a mortalidade é a sensibilidade que estes organismos apresentam à radiação ultravioleta. Estudos têm mostrado que algumas ascídias dispõem de substâncias em suas túnicas que absorvem a radiação ultravioleta (HIRABAYASHI *et al.*, 2006; HIROSE *et al.*, 2004) o que indicaria as diferentes

sensibilidades entre as espécies. Como observamos, é incerta qual a verdadeira relação entre as ascídias e diatomáceas, sendo assim necessários mais estudos para identificar precisamente as relações simbióticas e os efeitos causados junto ao hospedeiro.

O DGGE no estudo de comunidades microbianas foi inicialmente utilizado por Muyzer, Waal e Uitterlinden (1993) para descrever comunidades complexas. Segundo os autores é possível obter apenas 1% da diversidade de comunidade microbiana.

Esta técnica foi utilizada neste estudo na obtenção do perfil da comunidade de micro-organismos, revelando assim o padrão de UTOs para cada amostra. No total, 18 UTOs foram observadas para a ascídia *Didemnum galacteum*. Os resultados obtidos contrastam com o estudo de Tait, Carman e Sievert (2007) que observaram apenas 2 UTOs. Segundo esses autores a baixa diversidade da microbiota encontrada por eles foi relacionada ao caráter ácido da túnica da ascídia *Didemnum* sp. Todavia, Dias (2004), avaliando a influência da acidez da túnica de espécies de ascídias da família Polyclinidae, Didemnidae, Clavelinidae e Styelidae sobre outros organismos, constatou que a acidez da túnica destas ascídias não impediu a epibiose.

Para a superfície da túnica de *Cystodytes* sp. o DGGE revelou uma microbiota representada por 9 UTOs. Martinez–Garcia (2007), com o mesmo estudo encontraram um total de 14 UTOs na microbiota associada à ascídia colonial *Cystodytes dellechiajei*. Novamente os resultados apresentados nesta pesquisa e comparados com outros são divergentes sugerindo que diversos fatores ambientais e biológicos podem estar influenciando o crescimento desta microbiota na superfície destes organismos hospedeiros. Entretanto, este estudo revelou apenas o padrão da diversidade destas comunidades microbianas, de forma que não foi possível determinar quais fatores estariam atuando na seleção desta microbiota.

A análise comparativa entre a microbiota presente na superfície das ascídias e na água do mar possibilitou observar que a maior riqueza de UTOs foi encontrada para as amostras coletadas na Praia dos Dois Coqueiros, resultados estes que sugerem que a região do entremarés possui uma microbiota mais diversa que a área portuária. A região entremarés é caracterizada por apresentar substrato natural e é altamente influenciada por fatores abióticos como temperatura, dessecação e influência das marés. Todos estes fatores estão diretamente ligados a hidrodinâmica do local e determinam a comunidade biológica que melhor se adapta a estas condições. Como já visto, as ascídias estão diretamente em contato com o substrato e apesar de todo o cuidado tomado para evitar contaminação da amostra no momento da coleta é possível que haja contribuições significativas da microbiota presente no substrato, fato este que pode ter contribuído para a alta diversidade encontrada no local. É importante ressaltar,

contudo, que os dados obtidos pelo presente estudo são pontuais e podem não representar adequadamente a microbiota da região como um todo.

Já a área portuária foi caracterizada por uma baixa diversidade e alta dominância destas poucas espécies. Nessas áreas pode haver grandes contribuições na diversidade de organismos devido à água de lastro utilizada no contrapeso das embarcações, contudo esses organismos podem ou não dominar o ambiente. Segundo Ruiz *et al.* (2000) o movimento global da água de lastro nas embarcações tem favorecido a dispersão e distribuição de micro-organismos pelo mundo. Então uma explicação plausível para a baixa diversidade encontrada na área portuária pode ser elucidada por dois fatores: primeiramente, muitos organismos podem chegar a estas regiões, mas poucos conseguem sobreviver não tolerando as condições do novo local. Segundo, em regiões portuárias há uma baixa diversidade em virtude dos impactos causados por efeitos negativos da poluição, definindo então a comunidade microbiana do local por meio da seleção das espécies mais resistentes.

Os índices de diversidade de Shannon (H') corroboraram com os resultados no número de UTOs demonstrados anteriormente. De acordo com este índice, a maior diversidade foi revelada para a microbiota presente na água do mar da praia dos Dois Coqueiros, seguida pelos resultados da superfície da túnica de *Didemnum galacteum*, microbiota da água do mar do porto do Pecém e superfície da túnica de *Cystodytes* sp. Estes valores no geral nos dão apenas uma informação da diversidade de UTOs desta comunidade.

O cálculo do índice de equitatividade (J') para todas as amostras foi muito semelhante, apontando para uma comunidade com a abundância de UTOs bem distribuída nas amostras. O cálculo da diversidade como apontado anteriormente corroborou a análise do perfil de bandas no gel, porém o índice de equitatividade mostra divergência quando comparamos com a imagem do gel que, apresenta bandas mais altas e intensas indicando dominância de UTOs.

O número de UTOs compartilhadas e exclusivas revelado pelo o diagrama de Venn indicou que a microbiota da água do mar nem sempre é encontrada no organismo que ali está imerso, mas sim o contrário, sugerindo a possibilidade de relações específicas de uma determinada microbiota, que pode ser transferida de geração em geração da colônia adulta para as larvas, em um processo denominado de transmissão vertical. No entanto, vale ressaltar também que além desta microbiota própria, os hospedeiros adquirem micro-organismos do ambiente através da transmissão horizontal.

Pérez-Matos, Rosado e Govind (2007) avaliaram a microbiota da ascídia colonial *Ecteinascidia turbinata*, em três diferentes pontos de coleta no Caribe. Utilizando a técnica do

DGGE, os autores encontraram praticamente todas as UTOs distintas para as três localidades, sendo apenas duas UTOs entre estas próximas aos três pontos, esta proximidade foi atribuída pelos autores como uma espécie compartilhada para esta ascídia entre os três pontos amostrados.

Tait, Carman e Sievert (2007), realizaram uma caracterização da comunidade microbiana presente nas gônadas da ascídia *Mogula manhattensis* através do DGGE e os resultados indicaram a presença de bactérias, representada por 1 UTO, indicando um único grupo.

Martinez–Garcia *et al.* (2007), estudando a ascídia *Cystodytes dellechiajei* e a sua larva, verificaram uma similaridade de 95% na análise do DGGE de acordo com o índice de Jaccard entre a comunidade microbiana para estes dois estágios. Os autores sugerem que estas bactérias são transmitidas verticalmente do organismo adulto para a larva.

Estas implicações e os resultados apresentados na presente pesquisa indicam possivelmente uma especificidade da microbiota quanto ao local de origem, mas também quanto à espécie hospedeira.

A identificação através do 16S rRNA resultou em classes de bactérias como: Proteobacteria, Cianobactéria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria e bactérias não cultiváveis. Contudo, o aspecto dominante entre os táxons foi apontado nas duas bibliotecas onde Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria se destacaram, confirmando com isso outros resultados já descritos que indicam a dominância destes táxons em ambientes marinhos (MARTÍNEZ - GARCÍA; DÍAZ - VALDÉS; ANTÓN, 2010; PÉREZ-MATOS; ROSADO; GOVIND, 2007; TAIT; CARMAN; SIEVERT, 2007).

Como apontado nos resultados Alphaproteobacteria (51%) destacou-se como o principal táxon na microbiota presente em *Didemnum galacteum*, com contribuições significativas de Gammaproteobacteria (24%). Nogales (2007) avaliando a composição de bactérias em áreas de costa impactadas por atividades de recreação observou a dominância de Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, onde a primeira foi associada a áreas não impactadas, e a segunda associada a áreas impactadas com elevada concentração de nutrientes do local oriundos da poluição.

Dentro das Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria classificadas para a microbiota de *Didemnum galacteum* não houve dominância de nenhuma espécie. O índice de equitatividade mostrou uma distribuição equilibrada das sequências com praticamente 1 sequência para cada UTO determinada. A diversidade encontrada para a praia dos Dois Coqueiros poderia ser um bom indício de área pouco impactada, apesar do turismo

desenvolvido na região, porém não se pode afirmar por falta de estudos específicos que comprovem a existência de fontes poluidoras e seus efeitos junto ao ecossistema marinho. A maioria dos trabalhos sobre diversidade de micro-organismos no ambiente marinho revela um grupo dominante dentro das classes acima indicadas e relacionam esta dominância a algum aspecto ambiental específico, o que não foi possível determinar seja pelo aspecto pontual do estudo seja pela falta de registro das condições oceanográficas da área.

Gammaproteobacteria foi o principal grupo revelado na microbiota de *Cystodytes* sp., com a dominância do gênero *Pseudomonas*. O gênero *Pseudomonas* têm sido encontrado em invertebrados marinhos, sedimento e água do mar (SANTOS *et al.*, 2010), porém Du *et al.* (2006) destacam que a presença deste gênero no ambiente marinho ainda não está bem definida. Pelczar Jr; Chan e Krieg (1997) destacaram que as *Pseudomonas* possuem a capacidade de degradar e usar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia. De acordo com Moore *et al.* (2010), as bactérias ambientais tem sido mais resistentes a antibióticos que patógenos clínicos, possivelmente resultantes da grande variabilidade de condições dos ambientes naturais.

Borin *et al.* (2009) avaliaram a comunidade microbiana de uma lagoa com diferentes níveis de contaminação e, segundo esses autores, Gammaproteobacteria estava associado à área poluída. Este táxon tem se mostrado resistente, estando presente em locais com condições adversas, a exemplo da área do porto do Pécem. Esta área deve receber diferentes fontes de poluição, tanto pela própria atividade desenvolvida como oriunda de outras fontes, o que pode revelar uma possível seleção da microbiota ali presente.

A quase exclusividade do gênero *Pseudomonas* encontrada nos resultados deste trabalho sugere que no porto do Pécem a poluição esteja selecionando naturalmente a microbiota, contudo não podemos destacar qual seja esta fonte poluidora.

A diversidade das bibliotecas calculadas pelo índice de Shannon se mostrou relativamente alta, principalmente para a microbiota da superfície da túnica de *Didemnum galacteum*. A baixa diversidade revelada para a biblioteca da ascídia *Cystodytes* sp em relação à biblioteca de *D. galacteum* pode ser explicada pela quase exclusividade de Gammaproteobacteria presente na amostra. Os resultados de diversidade corroboraram com o índice de equitatividade das bibliotecas, onde o total de sequências como citado anteriormente mostrou-se praticamente 1 para cada UTO em *Didemnum galacteum*, ao passo que em *Cystodytes* sp. houve a dominância de 36 sequências para a espécie *Pseudomonas putida* e 20 sequências para a espécie *Pseudomonas* sp.

A curva de rarefação para as duas bibliotecas se mostrou crescente principalmente para a biblioteca da ascídia *Didemnum galacteum*, este resultado indica que apenas uma parcela da comunidade microbiana foi conhecida, indicando que se o esforço amostral tivesse sido maior poderíamos revelar uma comunidade microbiana ainda mais diversa.

Os outros grupos encontrados nas sequências extraídas da microbiota da ascídia *Didemnum galacteum* não foram tão representativos como para Proteobacteria. De acordo com a comparação no GenBank, as cianobactérias foram representadas por uma sequência para *Synechococcus* sp com 99% de similaridade, *Symploca* sp 96%, *Cyanobium* 99% e *Stigonema ocellatum* 96%. Nenhuma sequência obtida nas bibliotecas correspondia com a cianobactéria *Prochloron* encontrada por meio da técnica de microscopia ótica. Há uma discrepância entre os dados óticos e moleculares para esta cianobactéria. Isso pode ter ocorrido pois o marcador utilizado neste trabalho para a região 16S não é específico apenas para cianobactérias como mostrado por Munchhoff, 2007. Além disso, pode ter ocorrido falha no PCR durante a amplificação favorecendo com que grupos com pouca quantidade de DNA tenham se perdido, sobressaindo apenas os grupos mais expressivos. Ainda assim, a técnica de clonagem nos permite pegar amostras aleatórias e, dada a diversidade presente nas amostras é possível que a sequência da cianobactéria *Prochloron* não tenha sido selecionada.

O uso individual de técnicas sejam elas moleculares, óticas ou qualquer outra, nem sempre fornece o resultado esperado devido às suas próprias limitações, sendo ideal então utilizá-las de forma que um resultado suporte o outro e que em conjunto forneçam melhores respostas aos questionamentos nos diversos campos de pesquisa.

As análises das sequências determinaram por meio da classificação quais os principais grupos das comunidades microbianas, com alguns ainda não cultiváveis. Um dos principais desafios atualmente além de conhecer esta diversidade é conseguir realizar o cultivo destes organismos.

Este foi o primeiro registro da diversidade microbiana associada às ascídias coloniais *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp. para a costa brasileira. Nenhum trabalho havia sido realizado com esse objetivo na região, estudos futuros podem verificar e comparar a microbiota de outras ascídias. O conhecimento dessa diversidade será importante pois permitirá a inclusão de uma parcela de organismos vivos que é frequentemente ignorada nos estudos dos ecossistemas marinhos.

6 – CONCLUSÕES

As ascídias coloniais *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp. revelaram uma microbiota bastante diversa na superfície externa da túnica, composta por bactérias, cianobactérias e diatomáceas epífitas.

A comunidade microbiana das amostras analisadas para a praia dos Dois Coqueiros região entremarés parece ser mais diversa que a microbiota da região portuária.

A microbiota associada às ascídias é distinta daquela presente na água do mar onde vivem.

Nas bibliotecas do 16S rRNA houve a dominância de bactérias. Dentre as bactérias o táxon dominante em todos os casos foi Proteobacteria, com Alphaproteobacteria para a ascídia *Didemnum galacteum* e Gammaproteobacteria para a ascídia *Cystodytes* sp. Outros representantes como Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Cyanobacteria e Bactérias não cultiváveis foram evidenciadas na microbiota de *Didemnum galacteum*, enquanto para *Cystodytes* sp. não houve nenhum destes representantes.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROSO, H. S. **Biodiversidade e Densidade da Comunidade Fitoplanctônica em Estuários do Ceará (NE - Brasil)**. 2010. 158. f. - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BINGHAM, B. L. REYNS, N. B. Ultraviolet radiation and distribution of the solitary ascidian *Corella inflata* (Huntsman). **Biol. Bull**, v.196, p.94 - 104. 1999.
- BORIN, S.; BRUSETTI, L.; DAFFONCHIO, D.; DELANEY, E. BALDI, F. Biodiversity of prokaryotic communities in sediments of different sub-basins of the Venice lagoon. **Research in Microbiology**, v.160, p.307 - 314. 2009.
- BRUSCA, R. C. BRUSCA, G. J., **Invertebrates**. Second ed., 2003.
- CERRANO, C.; CALCINAI, B.; CUCCHIARI, E.; DI CAMILLO, C.; TOTTI, C. BAVESTRELLO, G. The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae). **Polar Biology**, v.27, n.4, p.231-237. 2004.
- CHENNA, R.; KUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. THOMPSON, J. D. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p.2947 - 2948. 2007.
- COLARES, G. B. **Diversidade e estrutura de comunidades microbianas associadas à rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do rio Pacoti, zona leste da costa cearense**. 2010. 60 f. f. - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- COSTA, M. M. S. **Diatomáceas Epífitas em *Galaxaura rugosa* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux (Rhodophyta) no arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil**. 2008. 68. f. -, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- COX, G. C. Comparison of Prochloron from Different Hosts. I. Structural and Ultrastructural Characteristics. **New Phytol.**, v.104, p.429 - 445. 1986.
- CUPP, E. E. **Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America**. California, v.5. 1943. 1 - 238 p.
- DU, H.; JIAO, N.; HU, Y. ZENG, Y. Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. **FEMS Microbiology Ecol**, v.57, p.92 - 105. 2006.
- DUNLAP, W. C.; BATTERSHILL, C. N.; LIPTROT, C. H.; COBB, R. E.; BOURNE, D. G.; JASPARS, M.; LONG, P. F. NEWMAN, D. J. Biomedicinals from the Photosymbionts of Marine Invertebrates: A Molecular Approach. **Elsevier**, v.42, p.358 - 376. 2007.
- GOODBODY, I. **The Physiology of ascidians**: Advances in Marine Biology, v.12. 1974. 1 - 149 p.

DIAS, G. M. **Estrutura de comunidade e variabilidade genética de ascídias coloniais do entremarés rochoso**. 2004. 131. f. - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

HALL, T. A. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98. **Nucl. acids. symp. ser.**, v.41, p.95 -98. 1999.

HIRABAYASHI, S.; KASAI, F.; WATANABE, M. M. HIROSE, E. Contents of ultraviolet-absorbing substances in two color morphs of the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle*. **Hydrobiologia**, v.571, p.419 - 422. 2006.

HIROSE, E. FUKUDA, T. Vertical transmission of photosymbionts in the colonial ascidian *Didemnum molle*: The larval tunic prevents symbionts from attaching to the anterior part of larvae. **Zoological Science**, v.23, n.8, p.669-674. 2006.

HIROSE, E. HIROSE, M. Morphological process of vertical transmission of photosymbionts in the colonial ascidian *Trididemnum miniatum* Kott, 1977. **Marine Biology**, v.150, n.3, p.359-367. 2007.

HIROSE, E.; HIROSE, M. NEILAN, B. A. Localization of Symbiotic Cyanobacteria in the Colonial Ascidian *Trididemnum miniatum* (Didemnidae, Ascidiacea). **Zoological Science**, v.23, p.435-442. 2006.

HIROSE, E. MARUYAMA, T. What are the benefits in the ascidian-*Prochloron* symbiosis? **Endocytobiosis cell res.**, v.15, p.51-62. 2004.

HIROSE, E.; OHTUSA, K.; ISHIKURA, M. MARUYAMA, T. Ultraviolet absorption in ascidian tunic and ascidian - *Prochloron* symbiosis **J.Mar. Biol. Ass. U.K.**, v.84, p.789 - 794. 2004.

HIROSE, E.; UCHIDA, H. MURAKAMI, A. Ultrastructural and microspectrophotometric characterization of multiple species of cyanobacterial photosymbionts coexisting in the colonial ascidian *Trididemnum clinides* (Tunicata, Ascidiacea, Didemnidae). **Eur. J. Phycol.**, v.44, p.365 - 375 2009.

HOEK, C.; MANN, D. G. JAHNS, H. M., **Algae: An Introduction a Phycologyed.**: Cambridge: Cambridge University, 1995. 627p.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. LOTUFO, L. V. C. Biological Activity in Extracts of Ascidiaceans (Tunicata, Ascidiacea) from the Northeastern Brazilian Coast **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.287, p.93 - 101. 2003.

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. p.1 -332. 2005.

KOTT, P. Related Species of *Trididemnum* in Symbiosis with Cyanophyta. **Proc. Linn. Soc. N. S. W.**, v.107 (4), p.515 - 520. 1984.

KOTT, P.; PARRY, D. L. COX, G. C. Prokaryotic Symbionts With a Range of Ascidian Hosts. **Bulletin of Marine Science**, v.34 (2), p.308 - 312. 1984.

LAMBERT, G. The general ecology and growth of a solitary ascidian, *Corella willmeriana*. **Biol. Bull**, v.135, p.296 -307. 1968.

LAMBERT, G. Ecology and Natural History of the Protochordates. **Canadian Journal of Zoology**, v.83, p.34 - 50. 2005.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L. PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.6955 - 6959. 1985.

LEE, Y. K.; LEE, J. H. LEE, H. K. Microbial symbiosis in marine sponges. **The journal of microbiology**, v.39, p.254 - 264. 2001.

LEWIN, R. A. Prochlorophyta - a matter of class distinctions. **Photosynthesis Research**, v.73, p.59 - 61 2002. 2002.

LEWIN, R. A.; CHENG, L. LAFARGUE, F. Prochlorophytes in the Caribbean. **Bulletin of Marine Science**, v.30 (3), p.744 -745. 1980.

LEWIN, R. A. WITHERS, N. W. Extraordinary Pigment Composition of a Prokaryotic Alga. **Nature**, v.256, p.735 -737. 1975.

LEWIN, R. A. A marine *Synechocystis* (cyanophyta chroococcales) epizoic on ascidians. **Phycologia** , v.14, p.153 - 160. 1975.

LOTUFO, T. M. C. DIAS, G. M. *Didemnum galacteum*, a New Species of White Didemnid (Chordata: Ascidiacea: Didemnidae) from Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.120 (2), p.137 -142. 2007.

LOTUFO, T. M. C. SILVA, A. M. B., **Orgs. Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará - Ascidiaceae**.: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 221 - 247p.

LOTUFO, T. M. C. **Ascidiacea (Chordata:Tunicata) do litoral tropical brasileiro**. 2002. 183.f. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

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

MANFIO, G. P., **Avaliação do Estado do Conhecimento da Biodiversidade Brasileira**ed. Brasília, 2006. 113 - 139p.

MARTÍNEZ - GARCÍA, M.; DÍAZ - VALDÉS, M. ANTÓN, J. Diversity of *pufM* genes, involved in aerobic anoxygenic photosynthesis, in the bacterial communities associated with colonial ascidians. **FEMS Microbiology Ecol**, v.71, p.387 - 398. 2010.

MARTÍNEZ - GARCÍA, M.; DÍAZ - VALDÉS, M.; WANNER, G.; RAMOS - ESPLÁ, A. ANTÓN, J. Microbial community associated with the colonial ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. **Environmental Microbiology**, v.9(2), p.521 - 534. 2007.

- MILLAR, R. H., **The Biology of Ascidiacea**.: Advances in marine Biology, 1971. 1 - 100p.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. LABOUE, P. Coral Reef Ascidiacea of New Caledonia. **Collections Faune Tropicale, N° XXX, ORSTOM Editions, Paris.**, p.247 p. 1991.
- MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MOORE, P. J. A.; MILLAR, B. C.; GOLDSMITH, C. E.; LOUGHREY, A. ROONEY, P. J. Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? **Aquat Ecol.**, v.44, p.349 - 358. 2010.
- MOSS, C.; GREEN, D. H.; PÉREZ, B.; VELASCO, A.; HENRIQYEZ, R. MCKENZIE, J. D. Intracellular bacteria associated with the ascidian *Esteinascidia turbinata*: phylogenetic and in situ hybridization analysis. **Marine Biology**, v.143, p.99 - 110. 2003.
- MUNCHHOFF, J.; HIROSE, E.; MARUYAMA, T.; SUNAIRI, M.; BURNS, B. P. NEILAN, B. A. Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. **Environmental Microbiology**, v.9, n.4, p.890-899. 2007.
- MUYZER, G.; 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 and Environmental Microbiology**, v.59, p.695 -700. 1993.
- NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Sci. soc. Am. J.**, v.71, p.562 - 571. 2007.
- NETO, J. A. B.; WALLNER-KERSANACH, M. PATCHINEELAM, S. M., **Poluição Marinha**. Interciência ed. Rio de Janeiro, 2008. 440p.
- NEWCOMB, E. H. PUGH, T. D. Blue - green algae associated with ascidians of the Great Barrier Reef. **Nature**, v.253, p.533 - 534. 1975.
- NOGALES, B.; AGUILÓ-FERRETJANS, M. M.; MARTÍN-CARDONA, C.; LATUCAT, J. BOSCH, R. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1913 - 1929. 2007.
- OKA, A. T.; SUETSUGU, M. HIROSE, E. Two New Species of *Diplosoma* (Ascidiacea: Didemnidae) Bearing Prokaryotic Algae *Prochloron* from Okinawajima (Ryukyu Archipelago, Japan). **Zoological Science**, v.22, p.367 - 374. 2005.
- 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. 1997.
- PACE, N. R. New Perspective on the Natural Microbial World: Molecular Microbial Ecology. **ASM News**, v.62, p.463 - 470. 1996.

PALENIK, B. HASELKORN, R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b- containing prokaryotes. **Nature**, v.355, p.265 - 267. 1992.

PATTERSON, G. M. L. WITHERS, N. W. Laboratory Cultivation of *Prochloron*, a Tryptophan Auxotroph. **Science**, v.217, p.1034 - 1035. 1982.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R., **Microbiologia**. 2^a ed.: Pearson Education, 1997. 524p.

PEREIRA, R. C. SOARES - GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro, v.1. 2002. 382 p.

PÉREZ-MATOS, A. E.; ROSADO, W. GOVIND, N. S. Bacterial diversity associated with the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.92, p.155-164. 2007.

PIELOU, E. C. Mathematical ecology. **New York: Wiley**, p.385 p. 1967.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre. 2000

RIBES, M.; CIMA, R. GILI, J.-M. Seasonal variation of *in situ* feeding rates by the temperate ascidian *Halocynthia papillosa*. **Marine Ecology Progress Series**, v.175, p.201 - 213. 1998.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M. LOTUFO, T. M. C., **Guia Ilustrado para a Identificação das Ascídias do Litoral Paulista**ed. São Paulo: IBUSP - FAPESP, 1998. 192p.

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. 1985.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M. MANN, D. G. **The Diatoms Biology & Morphology of the Genera**. New York: Cambridge University Press. 1990

RUIZ, G. M.; RAWLINGS, T. K.; DOBBS, F. C.; DRAKE, L. A.; MULLADY, T.; HUQ, A. COLWELL, R. R. Global spread of microorganisms by ships - Ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens. **Nature**, v.408, n.6808, p.49-50. 2000.

SANTOS, O. C. S.; PONTES, P. V. M. L.; SANTOS, J. F. M.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. LAPORT, M. S. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. **Research in Microbiology**. 2010.

SCHLOSS, P. D. HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1501 - 1506. 2004.

SCHMIDT, E. W.; SUDEK, S. HAYGOOD, M. G. Genetic Evidence Supports Secondary metabolic Diversity in *Prochloron* spp., the Cyanobacterial Symbiont of a tropical Ascidian. **J. Nat. Prod.**, v.67, p.1341 - 1345. 2004.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v.27, p.379 - 423. 1948.

SUTHERLAND, D. L. Surface-associated diatoms from marine habitats at Cape Evans, Antarctica, including the first record of living *Eunotogramma marginopunctatum*. **Polar Biology**, v.31, n.7, p.879-888. 2008.

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

TOTTI, C.; CALCINAI, B.; CERRANO, C.; DI CAMILLO, C.; ROMAGNOLI, T. BAVESTRELLO, G. Diatom assemblages associated with *Sphaerotylus antarcticus* (Porifera : Demospongiae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.4, p.795-800. 2005.

URBACH, E.; ROBERTSON, D. L. CHISHOLM, S. W. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. **Nature**, v.355, p.367 - 369. 1992.

USHER, K. M. The ecology and phylogeny of cyanobacterial symbionts in sponges. **Marine Biology**, v.29, p.178 -192. 2008.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. Rio de Janeiro: Interciência. 2000. 114 p.

WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H. ROHWER, F. Metagenomic analysis of the microbial community associated with coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, v.9, p.2707-2719. 2007.

WITHERS, N. W.; ALBERTE, R. S.; LEWIN, R. A.; THORNBER, J. P.; BRITTON, G. GOODWIN, T. W. Photosynthetic unit size, carotenoids, and chlorophyll-protein composition of *Prochloron* sp., a prokaryotic green alga. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p.2301 - 2305. 1978.

WOESE, C. R.; KANDLER, O. WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.4576 - 4579. 1990.

8 – APÊNDICE

8. 1 – APÊNDICE A – MEIOS E SOLUÇÕES

1 – Tampão fosfato

Para 100 mL

20 mL de solução estoque de fosfato ácido de sódio

80 mL de solução estoque de fosfato sódio dibásico

Ajustar o pH para 7,4.

2 – Tampão de Extração de DNA – CTAB 2%

Para 100 mL

2 g de CTAB

8,1816 g de NaCl

1,2114 g de Tris

0,5845 g de EDTA

Água MilliQ

Ajustar o pH para 8,0 e autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

3 – Meio LB (Luria – Bertani)

Para 250 mL

2,5 g de Bacto Triptona

1,25 g de Extrato de Levedura

1,25 g de NaCl

3,75 g de agar

Água MilliQ

Ajustar o pH para 7,0 e autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

4 – Meio SOB

Para 100 mL

2 g de Triptona

0,5 g de Extrato de Levedura

0,05 g de NaCl

1 mL de KCl

Ajustar o pH para 7,0 e autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

Adicionar 1,0 mL de MgCl₂ 1 M, esterilizado por filtração.

5 – Meio SOC

Para 10 mL

8,0 mL de meio SOB
2,0 mL de glicose 1 M, esterilizada por filtração.

6 – Acetato de Potássio 3M

Para 100 mL

29,44 g de Acetato de Potássio
11,5 mL de Ácido Acético Glacial
Água MilliQ q.s.p. 100 mL

7 – GET

Para 500 mL

1,46 g de EDTA
0,66 g de Tris
Água MilliQ q.s.p. 472 mL

Ajustar o pH para 8,0 e autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
Adicionar 28 mL de Glicose 20%, esterilizada por filtração.

8 – SDS + NaOH

Para 3,0 mL

300 µL de SDS 10%
150 µL de NaOH 4M
Água MilliQ q.s.p. 3,0 mL

9 – Solução de Acrilamida

Para 100 mL

38,93 g de Acrilamida
1,07 g de Bis-Acrilamida
Água MilliQ q.s.p. 100 mL

10 – Tampão TAE – 50 X

Para 7000 mL

140 mL de Tampão TAE 50 X
6860 mL de Água Destilada

11 – Tampão da amostra (Azul de Bromofenol)

Para 10 mL

3,45 mL de Glicerol
0,125 g de Azul de Bromofenol

Ajustar o pH para 8,0 com TE

12 – Meio 2XYT

Para 200 mL

3,2 g de Triptona
2 g de Extrato de Levedura
1 g de NaCl
Água MilliQ q.s.p 200 mL

13 – Meio GYT

Para 10 mL

1 mL de glicerol
0,0125 g de Extrato de levedura
0,025 g de Triptona
Água MilliQ q.s.p 10 mL

8.2 – APÊNDICE B – LISTA DE REAGENTES

Metanosulfonato de Tricaína.....	Finquel
Formaldeído.....	Synth
Bacto Triptona.....	Difco
Extrato de Levedura.....	Himedia
Agar	Himedia
Triptona.....	Fluka
Acetato de Potássio.....	Fischer Scientific
Ácido Acético.....	Cromoline
Acrilamida.....	Merck
Clorofórmio.....	Cromoline
Álcool Isoamílico.....	Reagen
Isopropanol.....	Amresco
NaOH.....	Vetec
Circle Grow.....	MP Biomediclas
TRIS.....	Invitrogen
CTAB.....	Amresco
KCl.....	Vetec
EDTA.....	Fischer Scientific
SDS.....	Merck
Etanol.....	Merck
RNAse.....	Promega
Primers.....	Invitrogen
Agarose.....	Invitrogen
Tampão.....	Promega
dNTPs.....	Promega
MgCl ₂	Promega
Borato.....	Reagen
Taq DNA Polimerase.....	Invitrogen
SVBR.....	Invitrogen
Marcador 1 Kb.....	Promega
Tampão de Ligação.....	Promega
Vetor P-GEM Easy.....	Promega

T4 DNA Ligase.....	Promega
Ampicilina.....	Sigma
X-Gal.....	Fischer Scientific
IPTG.....	Fischer Scientific
Kit de Purificação de DNA.....	Promega