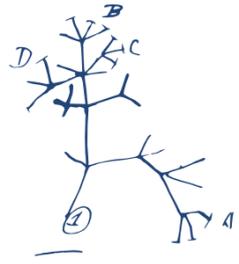




Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade
e Biologia Evolutiva



Do micro ao macro: o efeito do aquecimento dos oceanos em Demospongiae (Porifera)



Tayara Caroline Fontana dos Santos

Rio de Janeiro
2019

Tayara Caroline Fontana dos Santos

Do micro ao macro: o efeito do aquecimento dos oceanos em Demospongiae (Porifera)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Michelle Klautau

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel da Silva Peixoto

Rio de Janeiro

2019

Capa: Esponja *Amphimedon viridis* em Piraquara de Fora, Angra dos Reis, RJ, Brasil, em março de 2018. **Foto:** Michelle Klautau.

d722m dos Santos, Tayara Caroline Fontana

Do micro ao macro: o efeito do aquecimento dos oceanos em Demospongiae (Porifera) / Tayara Caroline Fontana dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2019. 55 f.

Orientadora: Michelle Klautau. Coorientadora: Raquel da Silva Peixoto. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2019.

1. Microbioma. 2. Aquecimento global. 3. Disbiose. 4. Doença em esponjas. I. Klautau, Michelle, orient. II. Peixoto, Raquel da Silva, coorient. III. Dissertação.

Tayara Caroline Fontana dos Santos

Do micro ao macro: o efeito do aquecimento dos oceanos em Demospongiae (Porifera)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carla Zilberberg – UFRJ (Membro Titular Interno)

Prof. Dr. Guilherme Muricy – MN/UFRJ (Membro Titular Externo)

Prof^a. Dr^a. Marinella Laport – UFRJ (Membro Titular Externo)

Prof^a. Dr^a. Claudia Russo – UFRJ (Membro Suplente Interno)

Dr. Victor Seixas – UFRJ (Membro Suplente Externo)

Rio de Janeiro
30 de Agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Michelle pela oportunidade de mais uma vez me orientar com tanta atenção por esses dois anos, dividindo seu conhecimento e tendo tanta paciência comigo. Muito obrigada por ter se arriscado nesse experimento ousado, mas lindo demais. Eu fiz com todo o meu amor e espero que juntas possamos colher bons frutos dele. Eu admiro muito a pessoa e a profissional que você é e agradeço por esses quase cinco anos de orientação. Tudo que aprendi com você levarei comigo!

Agradeço muito à minha coorientadora Raquel pelo suporte durante esse projeto que eu amei fazer. Muito obrigada por ser minha coorientadora e me apresentar o fantástico mundo microbiológico. Ver sua empolgação e seu amor pelo seu trabalho é contagiante e dá vontade de desbravar o mundo todo. Muito obrigada! A todos os "labiporianos" (Andrezinho, Bárbara, Carol, Fernanda, Gabi, Matheus, Raísa e Sara) agradeço imensamente todas as conversas, as idas à Vila para aliviar o estresse, bandejões e muitos risos (alguns de desespero, rs). Levo vocês comigo junto com as melhores memórias da universidade. Vocês são incríveis!!!

Agradeço também ao professor Paulo Salomon, graças a você conseguimos obter os dados de temperatura do trabalho. Ao AquaRio pelo empréstimo dos equipamentos de análise em campo e por ceder o espaço, equipamentos e funcionários para rodar outras análises. Ao Mário, pela companhia e ajuda com o experimento. Por ter cedido seu tempo para dirigir, guardar as amostras, levar o caiaque com a garrafa de nitrogênio líquido! Você foi incrível. Muitíssimo obrigada ao Felipe, Isadora e o maravilhoso barco "Siri cascudo" que graças à vocês, o experimento foi possível. Muito obrigada pela ajuda de todos. Graças à essas colaborações, podemos realizar esse trabalho.

À minha família teria que agradecer eternamente pela motivação, apoio e principalmente por acreditarem que eu era capaz de alçar vôo em busca do que eu sempre quis. Graças a vocês pousei aqui na UFRJ e olha aonde cheguei?! Vou ser mestra! Mamãe, Agatha, Keké, Tutu, minha irmãe querida Bruna, Vovó Cida e Vovô Zé muito obrigada pela ajuda, orações, suporte. Que coisa mais linda ter nascido nessa família. Ainda no parágrafo família, não poderia deixar de citar à minha família espiritual. À família Calma, só posso agradecer infinitamente a toda egrégora da casa, vovó Maria e especialmente ao Henrique e a Cacau. O que vocês fizeram por mim não tem preço, mas tem um valor inestimável. Obrigada pelo cuidado em todos os sentidos. Vocês dois são a personificação do que é amor ao

próximo. Eu tenho uma hipótese de que vocês têm tanto amor no coração, que chega a transbordar, por isso resolveram dividir comigo. Que sorte a minha! A benção!

Não posso deixar de agradecer o ser humano que tive a oportunidade de reencontrar aqui... Ricardo, você é um presente em minha vida! Desde o início você se mostrou um verdadeiro companheiro. Desde a ajuda com os trabalhos das disciplinas da pós, até me ajudando com as planilhas da dissertação, você estava lá comigo. Sorrindo ou chorando, você estava lá! Empolgada ou desaminada com a vida acadêmica, você estava lá! Você merece muito mais do que essa dedicatória. Eu te amo muito.

Eu não posso deixar de agradecer ao universo e todos os seus mistérios por tudo que já me aconteceu até conseguir chegar aqui. O que foi ruim me fez forte e madura o suficiente para acreditar em mim mesma e o que foi bom, só deixou o caminho mais fácil e leve de trilhar. Aos orixás, minha total gratidão. Mamãe Oxum, obrigada por essa água doce que circulou em mim durante essa trajetória, me polindo, tirando as partes mais pontiagudas e trazendo doçura para os meus dias. Através do seu espelho não olhei para mim, mas olhei para trás e pude ver o quanto consegui caminhar. Ora yê yê ô! Mãe Iemanjá, Oriô!! Muito obrigada por cuidar da minha cabeça, desse meu barquinho que quase virou, mas conseguiu se equilibrar, graças às suas benções e cuidado. Gratidão por me ajudar enxergar além das ondas. Pude ver que depois da arrebentação tem um horizonte pacífico, onde a calmaria faz morada. Odociaba, minha mãe! Nas montanhas também tive o privilégio de apreciar a honestidade de Xangô, que cuida de mim para que todos os dias eu seja justa, mas não julgadora. Durante a subida, algumas pedras rolaram, mas seus filhos "bambeiam, mas não caem". Kaô Kabecile! Nas matas da jurema observei Oxossi com o foco que eu precisava ter, trazendo sua caça com uma única flecha. Precisão, meu pai. Objetividade! Oke Arô!! Obrigada à todos os guias, mentores e protetores espirituais que me aconselharam e cuidaram de mim durante todo esse tempo. Com a malandragem e sagacidade dos guardiões, simplicidade e humildade dos pretos-velhos, objetividade dos caboclos e alegria dos ibejis, continuarei trilhando meu caminho por aí. Axé!

RESUMO

Atualmente, estamos presenciando um aumento de relatos de doenças em esponjas, que estão sendo associadas ao aumento de temperatura dos oceanos. No entanto, existem estudos muito limitados sobre a resposta do holobionte esponja às mudanças climáticas e pouco sabemos sobre a etiologia dessas doenças. Com isso, o presente estudo teve como objetivos: (1) Identificar a diversidade de bactérias associadas a *Amphimedon viridis* e a *Chondrilla* aff. *nucula*; (2) Avaliar se a microbiota de esponjas submetidas a temperaturas altas é alterada; (3) Verificar se o aumento da temperatura provoca doenças em esponjas. A saída de água quente da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto (CNAAA) oferece uma oportunidade de explorar os efeitos do aquecimento dos oceanos in situ e o sequenciamento do gene 16S possibilita uma melhor compreensão sobre a resposta da comunidade microbiana da esponja holobionte frente ao aumento da temperatura do mar. As esponjas *Amphimedon viridis* e *Chondrilla* aff. *nucula*, usadas como modelo no presente trabalho, responderam de maneira diferente ao aumento de temperatura; entretanto, ambas as espécies abrigaram comunidades microbianas significativamente diferentes no tratamento com temperatura elevada em relação ao controle. Além disso, a temperatura elevada afetou negativamente a saúde dos indivíduos de *A. viridis*, tendo em vista que 50% deles apresentaram necrose em seu tecido e um morreu. Juntos, a mudança da microbiota e a resposta morfológica da esponja, destacam uma possível barreira na capacidade dessa espécie em resistir e se adaptar em um oceano com temperaturas mais altas. Em contraste, *C. aff. nucula* não apresentou alterações morfológicas aparentes mesmo com mudança em sua microbiota. Portanto, esse estudo contribui evidenciando que as respostas à temperatura elevada são específicas da espécie e que a estabilidade e flexibilidade das parcerias microbianas podem exercer um papel importante na aptidão e sucesso de esponjas.

Palavras-chave: microbioma, aquecimento global, disbiose, doença em esponjas

ABSTRACT

Currently, we are witnessing an increase in sponge disease reports, which are being associated with ocean warming. However, there are limited studies on sponge holobiont response to climate change and little is known about the etiology of these diseases. Thus, the present study aimed to: (1) Identify the diversity of bacteria associated with *Amphimedon viridis* and *Chondrilla* aff. *nucula*; (2) To evaluate if the microbiota of sponges subjected to high temperatures is altered; (3) Check if rising temperature causes disease in sponges. The warm water outlet from the Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto (CNAAA) offers an opportunity to explore *in situ* effects of ocean warming and 16S gene sequencing provides a better understanding on the response of the holobiont sponge microbial community facing the increase of sea temperature. The sponges *Amphimedon viridis* and *Chondrilla* aff. *nucula*, used as a models in the present work, responded differently to the temperature increase; however, both species harbored significantly different microbial communities in the high temperature treatment compared to the control. In addition, the high temperature negatively affected the health of *A. viridis*, given that 50% of them had tissue necrosis and one died. Together, the microbiota change and sponge morphological response highlights a possible barrier to this species' ability to resist and adapt in an ocean with higher temperatures. In contrast, *C.aff. nucula* showed no apparent morphological alterations even with its changing microbiota. Therefore, this study contributes by highlighting that responses to elevated temperature are species specific and that the stability and flexibility of microbial partnerships can play an important role in sponge fitness and success.

Keywords: microbiome, global warming, dysbiosis, sponges diseases

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Filo Porifera Grant, 1836.....	1
1.2.	Microbiota.....	2
1.3.	Aquecimento dos oceanos e doenças em esponjas.....	4
2.	OBJETIVOS.....	8
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1.	Coleta.....	9
3.2.	Transplantes.....	9
3.3.	Análise da água.....	10
3.4.	Extração e Sequenciamento.....	11
3.5.	Análise de dados.....	11
4.	RESULTADOS.....	12
4.1.	Efeito da temperatura.....	12
4.2.	Análise da água.....	14
4.3.	Microbiota.....	14
5.	DISCUSSÃO.....	25
5.1.	Microbioma.....	25
5.2.	Efeito da temperatura no holobionte esponja.....	27
6.	CONCLUSÃO.....	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
8.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 FILO PORIFERA GRANT, 1836

O filo Porifera abrange os metazoários mais antigos que conhecemos, com sua origem há cerca de 600 milhões de anos (Li *et al.*, 1998). As esponjas são sésseis, filtradoras, com estrutura corporal simples (Bergquist, 1978). Esses animais possuem poros, um sistema de canais inalantes e exalantes, além de câmaras revestidas por células flageladas, chamadas coanócitos. Essas células geram uma corrente de água unidirecional, graças ao batimento de seu flagelo, e capturam partículas de alimento e oxigênio (Hentschel *et al.*, 2012). Esse conjunto de poros, canais e câmaras constitui o sistema aquífero, que é a principal autapomorfia do grupo e que reflete seu monofiletismo (Hooper & Van Soest, 2002). Atualmente, o filo está dividido em quatro classes viventes: Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida e Homoscleromorpha (Gazave *et al.*, 2012; Figura 1. A-D), com uma diversidade que ultrapassa 9.000 espécies válidas (Van Soest *et al.*, 2019). Os poríferos possuem representantes marinhos e dulcícolas, ocupando diversos habitats que vão desde regiões polares, passando por temperadas até tropicais, podendo ser encontrados desde a zona entre marés até o oceano profundo (Rapp *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2017).

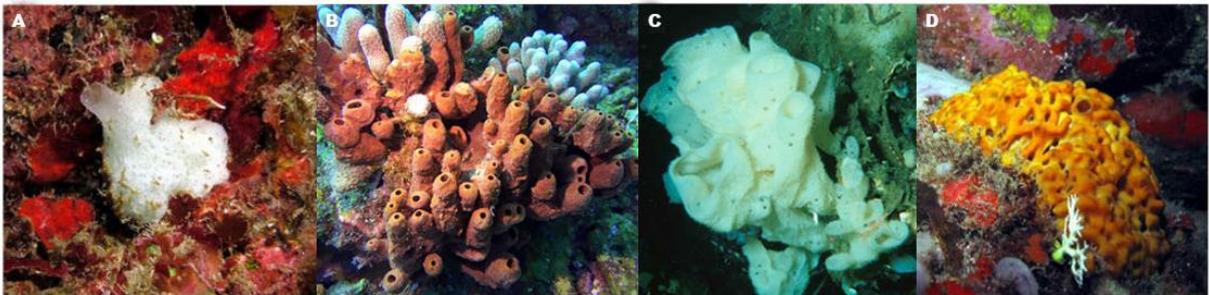


Figura 1. A. Calcarea: *Leucetta floridana*, retirado de Pérez *et al.*, 2017 (Foto: Thierry Pérez) B: Demospongiae (Foto: Thierry Pérez). C. Hexactinellida: *Atlantisella* sp., retirado de Van Soest *et al.*, 2012; D. Homoscleromorpha: *Oscarella* sp., retirado de Pérez *et al.*, 2017 (Foto: Thierry Pérez).

Historicamente, as esponjas apresentam grande relevância econômica no comércio de esponjas de banho (Pronzato *et al.*, 2008). As esponjas de banho são comercializadas intensamente desde o século XIX, embora existam registros de seu comércio desde a Antiguidade (Bidder, 1896). Embora o comércio de esponjas de banho tenha reduzido em relação ao século XIX, esse mercado ainda é uma considerável fonte de renda e uma atividade social importante em países como Grécia, Tunísia e Líbia, que são os principais comerciantes de esponja na atualidade (Pronzato *et al.*, 2008).

Economicamente, os poríferos também são conhecidos como fontes de produtos naturais de importância médica e relevância na indústria farmacêutica (Hentschel *et al.*, 2001). As atividades das substâncias isoladas a partir de esponjas incluem propriedades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, entre outras (Munro *et al.*, 1987; Schmitz, 1994; Hentschel *et al.*, 2001). Originalmente, a produção de metabólitos secundários pelas esponjas foi atribuída somente a elas, entretanto, alguns estudos evidenciaram a participação de microrganismos associados às esponjas na produção desses metabólitos (Unson & Falkner, 1993; Unson *et al.*, 1994; Bewley *et al.*, 1996; Hentschel *et al.*, 2001).

1.2 MICROBIOTA

Sabe-se há bastante tempo que os microrganismos associados às esponjas podem compreender até 60% da biomassa de algumas espécies (Hentschel, 2006; Webster, 2007; Thomas *et al.*, 2010). No entanto, o primeiro estudo abrangente sobre a microbiota de Porifera só foi realizado em 2016. Nesse estudo, 81 espécies de esponjas foram analisadas e pelo menos 39 filos e candidatos a filos microbianos foram encontrados (Thomas *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2018). Dentre esses microrganismos, foi detectada uma grande quantidade de bactérias heterotróficas, cianobactérias e arqueias, porém, os filos bacterianos mais dominantes foram Proteobacteria (principalmente Gamma e Alphaproteobacteria), Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae, Cyanobacteria e o candidato a filo Poribacteria. Em Archaea, o filo Thaumarchaea representou o grupo dominante (Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017; Pita *et al.*, 2018). Essa microbiota pode ser adquirida pelas esponjas durante a filtração da água do mar ou por transferência vertical (Hentschel *et al.*, 2002; Webster, 2007; Thomas *et al.*, 2010).

As comunidades microbianas nas esponjas podem ser formadas tanto por microrganismos generalistas, encontrados na maioria das espécies de esponjas, quanto especialistas, presentes em algumas espécies, mas raros ou ausentes na maioria das outras (Erwin *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2018). Os simbiontes considerados generalistas, além de serem encontrados na maioria das espécies, também são encontrados em grande proporção na espécie hospedeira (Thomas *et al.*, 2016). As interações microrganismo-hospedeiro são consideradas complexas e essas comunidades microbianas associadas são divididas em um microbioma central: com microrganismos dominantes em todos os indivíduos de uma mesma espécie hospedeira; e um microbioma variável: com

microrganismos que são observados apenas em alguns indivíduos ou que variam sua abundância relativa (Hester *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2018).

Os microrganismos que vivem em associação com as esponjas desempenham funções que são amplificadas por elas e, por meio de um efeito cascata, essas funções podem contribuir inclusive com o ecossistema (Pita *et al.*, 2018; Figura 2). Algumas dessas funções são: participação na produtividade primária por meio da fotossíntese de cianobactérias associadas (Freeman *et al.*, 2011), ciclagem de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, que são nutrientes limitados no ambientes marinho (Fiore *et al.*, 2015) e transformação de metabólitos que servem como defesa química para as esponjas (Hentschel *et al.*, 2001). Além disso, essa relação tem um papel importante na transformação da matéria orgânica dissolvida (MOD) em matéria orgânica particulada (MOP), capaz de ser metabolizada por outros organismos, conectando a fauna bento-pelágica (*sponge loop* - Goeij *et al.*, 2013). Assim, essa relação microbiota-esponja é fundamental para o bom funcionamento do metabolismo das esponjas e mesmo para o seu desempenho no ecossistema.

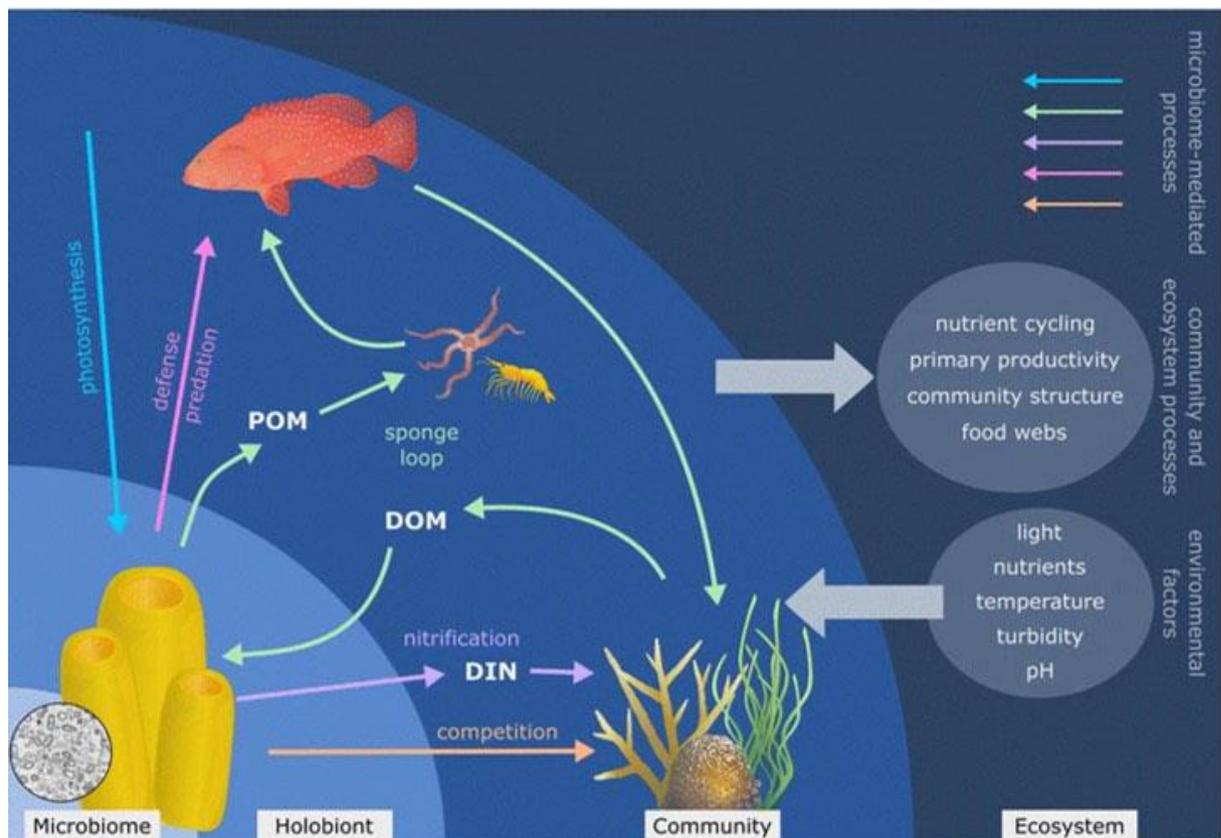


Figura 2. Adaptado de Pita *et al.*, 2018. Efeito em cascata das principais funções realizadas pelo microbioma (setas coloridas) influenciando o holobionte, a estrutura da comunidade e o funcionamento do ecossistema. DOM= matéria orgânica dissolvida; POM= matéria orgânica particulada; DIN= nitrogênio inorgânico dissolvido

Considerando essa estreita relação entre as esponjas e seus simbiontes, o termo holobionte foi proposto por Webster & Taylor (2012). Com isso, entende-se que os processos metabólicos que ocorrem nas esponjas não são determinados apenas por elas, mas pelas suas interações com a microbiota (Pita *et al.*, 2018). Sendo assim, o holobionte esponja consiste em um metaorganismo, ou seja, um organismo estreitamente dependente desse equilíbrio com seus microrganismos, tanto para a manutenção de sua saúde como para ajudá-lo a responder a variações ambientais (Foster *et al.*, 2017; Pita *et al.*, 2018).

1.3. AQUECIMENTO DOS OCEANOS E DOENÇAS EM ESPONJAS

Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), mudanças como as que estamos vivenciando atualmente serão agravadas se as emissões de gases permanecerem como estão (Sampaio & Rosa, 2019). Isso implicará na alteração de vários fatores abióticos associados à alta emissão de gases, especialmente do dióxido de carbono (CO₂), que representa grande parte dessas emissões. Nos oceanos, essa emissão de gases resultará no aumento da temperatura e na acidificação (Sampaio & Rosa, 2019). De acordo com o IPCC (2013), o aumento médio da temperatura do mar deverá ser de 1° a 3,5 °C até o final do século 21.

A problemática não está apenas em quantos graus a temperatura vai subir, mas de que maneira isso vai ocorrer. Segundo o IPCC (2013), também está previsto um aumento da frequência e da magnitude das ondas de calor no ambiente marinho (Sampaio & Rosa 2019). Isso quer dizer que a temperatura dos oceanos, em determinados lugares, pode aumentar de maneira abrupta e não gradativa e é sabido que os organismos são geralmente mais afetados por mudanças rápidas nas condições abióticas do que por mudanças graduais (Sampaio & Rosa 2019). Já existem estudos mostrando que esses eventos de aumento rápido de temperatura se mostraram negativos sobre os ecossistemas marinhos em algumas regiões da Austrália, noroeste do Atlântico e nordeste do Pacífico (Oliver *et al.*, 2018), atingindo florestas de algas e recifes de corais (Oliver *et al.*, 2018; Arias-Ortiz *et al.*, 2018; Sampaio & Rosa 2019).

Os impactos do aumento da temperatura da superfície do mar têm sido amplamente relatados e discutidos para corais e sua comunidade microbiana (Sokolow, 2009; Bourne *et al.*, 2016). Já para esponjas, esses estudos são ainda muito insipientes (Yang *et al.*, 2019).

Assim como nos corais, surtos de doenças e mortalidade em massa também acometem esponjas e esses registros nas últimas décadas têm sido cada vez mais frequentes. A primeira revisão sobre doenças em esponjas foi publicada em 2007 (Webster, 2007) e os dados são

alarmantes. Do final do século XIX até meados do século XX, os registros de mortalidade em massa de esponjas eram, em sua maioria, de esponjas de banho. *Hippospongia equina*, *Hippospongia* sp. e “Commercial spp.” foram alvo de doenças e tiveram suas populações reduzidas em 70 a 95% em alguns casos, o que prejudicou severamente o comércio e a economia de diversas regiões, como Caribe (Bahamas, Cuba, Honduras), Flórida e Tunísia (Brice, 1896; Allemand-Martin, 1906; Allemand-Martin, 1914; Galstoff, 1939; Walton Smith, 1939; Smith, 1941; Galstoff, 1942). Alguns casos foram associados com o aumento de temperatura e, embora fungos estivessem sempre presentes nas lesões, o agente patogênico não foi identificado (Webster, 2007).

Na década de 1980, outros episódios de mortalidade em massa foram observados em esponjas de banho, devastando as populações de *Hippospongia* spp. e *Spongia* spp. no Mediterrâneo e comprometendo novamente a economia local (Vacelet, 1994). A temperatura elevada do mar também foi atribuída como uma possível causa e uma bactéria não identificada foi relacionada à doença (chamada de "*Spongin boring necrosis*"), porém, não houve nenhuma confirmação (Vacelet, 1994; Vacelet *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 2007).

Na década de 1990, novos casos de doenças em esponjas foram relatados. No Mediterrâneo, entre 1994-1996, as espécies *Ircinia spinosula* e *Ircinia* sp. apresentaram mortalidade em massa, mas o agente patogênico não foi reconhecido (Corriero *et al.*, 1996). Em 1996, houve um registro de doença em *Xestospongia muta*. Vários indivíduos doentes foram encontrados nas Bahamas (Paz, 1997), sem que o agente causador fosse descoberto. Na grande barreira de corais (GBR), em 1998, indivíduos da esponja *Rhopaloeides odorabile* apresentaram rompimento da pinacoderme, o que expunha seu esqueleto (Webster, 2002). Nesse estudo, o agente causador desse distúrbio foi identificado como sendo uma bactéria do filo Alphaproteobacteria (Webster, 2002). Entre 1996-2000, em Papua Nova Guiné, foram verificados distúrbios em três espécies de esponja: *Ianthella basta* (com lesões marrons), *Jaspis* sp. (com tecidos necrosados) e *Xestospongia* spp. (com biofilme marrom) (Cervino *et al.*, 2006).

Já no século XXI, novos relatos foram feitos. Foram encontrados indivíduos de *Xestospongia muta* com diferentes tipos de distúrbios no Caribe. Em Curaçao, no ano 2000, os indivíduos apresentaram necrose (Nagelkerken *et al.*, 2000). Entre 2004-2005, no México, 100% dos espécimes de *X. muta* foram afetados pela doença “*White spot*” (Gammill & Fenner, 2005). Na Flórida, em 2005, a mesma espécie apresentou bandas cor de laranja entre o tecido saudável e o tecido doente. A doença foi denominada “*Orange band*” (Coward *et al.*, 2006). Em nenhum desses registros o agente patogênico foi identificado. Espécimes de

Aplysina aerophoba apresentaram necrose maciça, associada ao aumento de temperatura na Grécia em 2001 (Skoufas, 2003). Nas Bahamas, durante o ano de 2004, indivíduos de *Aplysina cauliformis* apresentaram necrose com coloração ferrugem, síndrome essa denominada “*Red band syndrome*”. Apesar de terem citado uma cianobactéria como responsável pela coloração, o agente patogênico continua incerto (Olson, *et al.*, 2006). Ainda em 2004, quase a metade dos indivíduos de *Tedania klaus* foram afetados por doenças em manguezais do Caribe (Wulff, 2006). Entre 2004 e 2005, no México, foram registradas lesões em quatro espécies de esponjas: *Callyspongia plicifera*, *Geodia* spp., *Ircinia* spp. e *Verongia gigantea*. O agente patogênico também permanece desconhecido (Gammill & Fenner, 2005). Além dos surtos de doenças registrados, existem outros relatos de mortalidade em massa resultando em reduções drásticas de populações de esponjas no Mediterrâneo (Cerrano *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2000; Warn, 2000; Laubier *et al.*, 2003), nas Índias Ocidentais (Vicente, 1989) e no Indo-Pacífico (T. Pérez, com. pess.). Esses eventos de mortalidade foram relacionados principalmente com o aumento da temperatura dos oceanos (Webster, 2007).

Mais recentemente, a esponja *Aplysina fulva* apresentou nos recifes de corais em Boca Del Toro, Panamá, a doença conhecida como “*Red Band*”. Essa doença foi associada principalmente a influências antrópicas (Gochfeld *et al.*, 2007). Ainda em 2007, na Eslovênia, indivíduos de *Aplysina aerophoba* apresentaram manchas pretas e necrose. Naquele trabalho, foi observada uma diferença entre a microbiota de indivíduos saudáveis e doentes (Webster *et al.*, 2008). Em 2010, na Austrália, a esponja *Ianthella basta* apresentou doença em 41% dos indivíduos analisados, entretanto, mais uma vez o agente patogênico e a causa da doença não foram identificados (Luter *et al.*, 2010). Ainda em 2010, foram publicados mais dois artigos reportando doenças em esponjas. No Mediterrâneo, as doenças em *Ircinia* foram associadas com o aumento da temperatura (Maldonado *et al.*, 2010) e no Caribe houve novamente relato de doença em *X. muta* (McMurray *et al.*, 2010). Em 2011, Cebrian e colaboradores (2011) registraram mortalidade em massa de duas espécies no Mediterrâneo: *Ircinia fasciculata* e *Sarcotragus spinosulum*. Esse episódio de mortalidade foi mais uma vez associado ao aumento da temperatura. Em 2012, no Caribe, indivíduos da espécie *Amphimedon compressa* apresentaram manchas brancas pelo corpo (“*Sponge White Patch*”), mas a causa e o agente patogênico não foram identificados (Angemeier *et al.*, 2012). Em 2016, foi publicado um artigo sobre *I. fasciculata*, que também apresentou indivíduos doentes na França. A causa foi correlacionada ao aumento da temperatura do mar e foi observada em sua microbiota diferença entre os indivíduos saudáveis e doentes (Blanquer *et al.*, 2016). Ainda naquele ano foram registradas lesões marrons na esponja *Agelas tubulata*, em Flórida

Keys. Essas lesões foram associadas ao aumento da temperatura, mas os possíveis microrganismos associados à lesão não foram identificados (Deignan & Pawlik, 2016). Embora a frequência dos relatos de doenças em esponjas aparentemente esteja aumentando, não podemos descartar que isso possa ser um artefato devido à falta de dados pretéritos e também pelo aumento nos monitoramentos voltados a essa temática atualmente (Webster & Taylor, 2012). De qualquer forma, a ocorrência de doenças em esponjas vem afetando inúmeras espécies em diferentes lugares do mundo, fazendo com que esse assunto mereça mais atenção (Slamby *et al.*, 2019).

Apesar da maioria desses registros de doenças em esponjas não apresentar a causa nem os patógenos envolvidos, as hipóteses mais levantadas estão relacionadas a condições ambientais adversas, tais como poluição, eutrofização, acidificação dos oceanos e, principalmente, elevação da temperatura do mar. Esses fatores poderiam comprometer a fisiologia das esponjas e sua relação com seus simbioss, desencadeando um estresse fisiológico e uma proliferação de microrganismos oportunistas e patogênicos (Coma *et al.*, 2009; Pita *et al.*, 2018). Porém, ainda são escassos na literatura trabalhos que tenham o objetivo de estudar sobre a resiliência e a resistência da associação microrganismo-esponja em condições ambientais adversas. Até o momento, poucos estudos avaliaram a correlação entre estresse ambiental e estabilidade das comunidades microbianas, porém, dentre esses trabalhos, o fator mais recorrente foi o aumento da temperatura do mar, (Lemoine *et al.*, 2007; López-Legentil *et al.*, 2008; 2010; Webster *et al.*, 2008; Webster & Taylor, 2012; Fan *et al.*, 2013; Blanquer *et al.*, 2016). Além disso, alguns estudos apontaram mudanças significativas nas comunidades microbianas de esponjas doentes (Webster *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2013; Blanquer *et al.*, 2016). Portanto, é possível que perturbações ambientais tenham algum impacto na saúde das esponjas e de sua microbiota, no entanto, essa relação ainda não está totalmente clara, precisando ainda ser mais bem investigada (Webster & Taylor, 2012; Pita *et al.*, 2018).

Visto que pouco sabemos sobre a etiologia das doenças em esponjas e que, de acordo com os registros de doenças publicados, populações de inúmeras espécies estão sujeitas a distúrbios talvez por um desequilíbrio na relação hospedeiro-microbiota causado por estresse ambiental, principalmente pelo aumento da temperatura do mar (Webster, 2007), é necessário investigar o real efeito da temperatura elevada no holobionte esponja. Com esse

conhecimento, será possível compreender um pouco mais sobre a relação esponja-microrganismos frente ao aquecimento dos oceanos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral verificar os efeitos do aquecimento dos oceanos nas espécies *Amphimedon viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864 e *Chondrilla* aff. *nucula* Schmidt, 1862. Os objetivos específicos foram:

1. Identificar a diversidade de bactérias associadas a *Amphimedon viridis* e a *Chondrilla* aff. *nucula*;
2. Avaliar se a microbiota de esponjas submetidas a temperaturas altas é alterada;
3. Verificar se o aumento da temperatura provoca doenças nessas esponjas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA

As coletas foram realizadas na cidade de Angra dos Reis, Rio de Janeiro, em dois pontos diferentes. O primeiro ponto escolhido foi na Ilha do Bonfim (-23° 02' S, 44° 33' O) (Figura 3). Essa localidade foi o tratamento controle, de onde foram retirados os espécimes para os transplantes. A Ilha do Bonfim está localizada a aproximadamente 200 metros da praia do Bonfim, na Baía da Ilha Grande. É um ambiente de águas rasas e calmas, de fácil acesso e com grande riqueza de esponjas.

O segundo ponto selecionado foi a praia de Piraquara de Fora (-23° 01' S, 44° 44' O) (Figura 3). Essa localidade é conhecida por apresentar águas superficialmente quentes (até cerca de 3 m de profundidade). Essa temperatura elevada deve-se à saída de água da usina nuclear do Centro Nuclear Almirante Álvaro Alberto (CNAAA), localizada nessa região e que utiliza água do mar para o resfriamento dos reatores. Como o intuito desse trabalho é avaliar o efeito da temperatura na microbiota das esponjas, escolhemos esse ponto como o tratamento de temperatura elevada.

As espécies selecionadas para esse experimento foram: *Amphimedon viridis* e *Chondrilla* aff. *nucula*. Ambas foram escolhidas por já existirem registros de doenças em espécies desses gêneros. Além disso, as duas espécies são fáceis de serem reconhecidas em campo e são abundantes na Ilha do Bonfim.

3.2. TRANSPLANTES

Um total de 16 indivíduos de *Amphimedon viridis* e 10 de *Chondrilla* aff. *nucula* foram coletados por mergulho livre na Praia no Bonfim. Todos os indivíduos de ambas as espécies foram marcados e numerados. Essas identificações foram feitas nas rochas onde as esponjas estavam aderidas.

Oito indivíduos de *Amphimedon viridis* e cinco de *Chondrilla* aff. *nucula* foram transplantados na própria Ilha do Bonfim para servirem como controle. Os demais foram transplantados para Piraquara de Fora. As esponjas foram transportadas por barco, ainda fixadas ao seu substrato, em recipientes de 20 L, até a localidade de destino. A profundidade na Ilha do Bonfim e em Piraquara de Fora foi a mesma, 1,5 m.

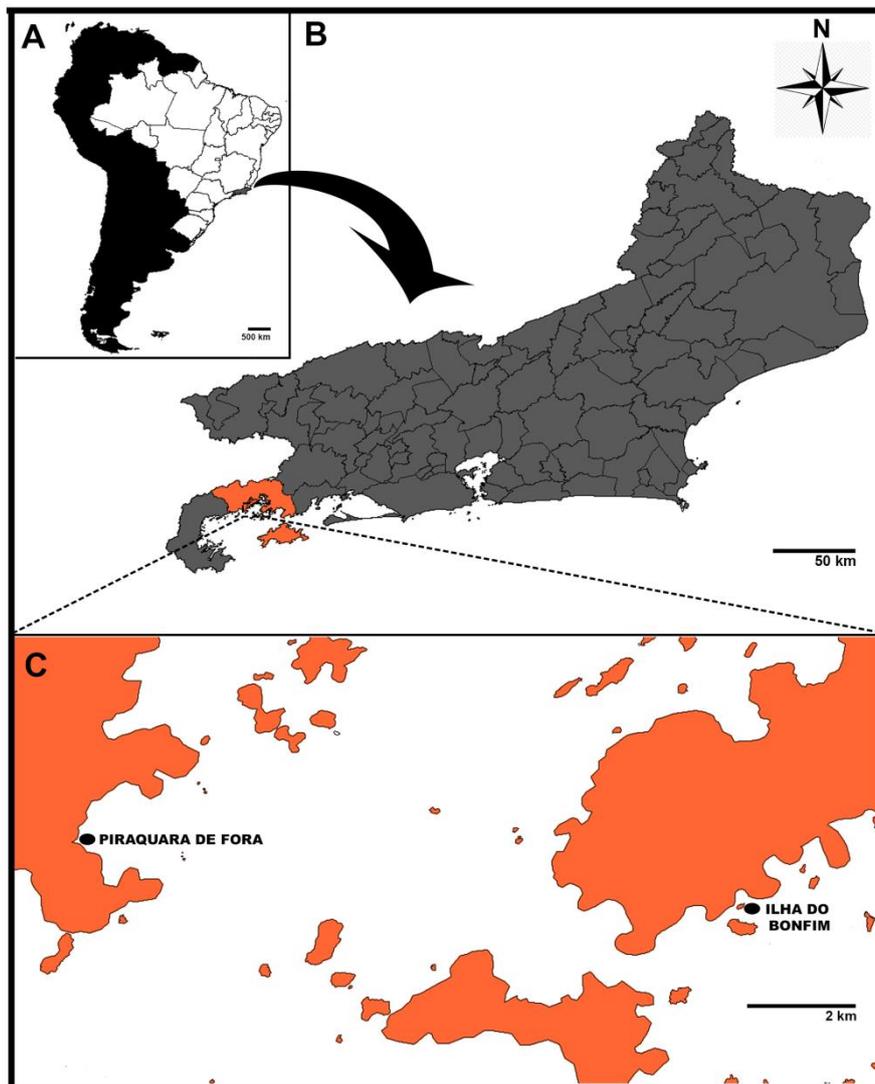


Figura 3. Mapa indicando os locais do experimento. A. América do Sul com destaque para o Brasil. B. Estado do Rio de Janeiro, enfatizando, em laranja, a região de Angra dos Reis. C. Pontos do experimento. Ilha do Bonfim: controle; Piraquara de Fora: tratamento com temperatura elevada.

As duas localidades receberam sensores (HOBO Pendant® Temperature) que mediram a temperatura de hora em hora durante todo o experimento. Antes dos transplantes, foi retirado um fragmento de cada indivíduo de ambas as espécies e o fragmento foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para a extração de DNA. Esse procedimento foi realizado no “tempo 0”, no “tempo 1” (após uma semana) e no “tempo 2” (após sete semanas).

3.3. ANÁLISE DA ÁGUA

Foram analisados na água: cloro total, amônia, nitrito e nitrato. O cloro total foi medido em campo com KIT de Cloro Universal Test Paper e em laboratório (no Aquário do

Rio de Janeiro - AquaRio) por espectrofotometria, utilizando-se o kit de reagentes para cloro total HI93737-01 da Hanna Instruments, seguindo o método adaptado de USEPA 300.5 e Métodos padrão 4500-CIG. Os resultados foram lidos no espectrofotômetro multiparâmetro HI 83200.

Para a dosagem de amônia, nitrito e nitrato foi usado o kit colorimétrico da Seratest e a leitura se deu por espectrofotometria (kit HI93715-03 para amônia, utilizando o método Nessler, reagente HI93708-01 para nitrito, seguindo o método adaptado de Sulfato de ferro e o reagente HI93728-01 para nitrato, seguindo método adaptado de redução de cádmio, todos da Hanna Instruments).

3.4. EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

As amostras que estavam congeladas em nitrogênio líquido tiveram seu DNA extraído com o Kit de extração PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, United States USA), seguindo a modificação do protocolo feita por Sunagawa *et al.* (2010). O DNA extraído foi quantificado no fluorímetro Qubit e armazenado em freezer -80° C. Posteriormente, procedeu-se com o sequenciamento do gene rRNA 16S na University of New South Wales (Sydney, Austrália) usando-se o protocolo do Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>; Thompson *et al.*, 2017). A região V4 foi amplificada utilizando-se o primer 515f-806rB e sequenciada na plataforma Illumina HiSeq2500 (Caporaso *et al.*, 2011).

3.5. ANÁLISE DE DADOS

Os dados de sequenciamento obtidos pela plataforma Illumina foram processados em Mothur v.1.31.2 (Schloss *et al.*, 2009). Inicialmente, sequências “*fastq de multiplexed*” foram filtradas e aparadas de acordo com a qualidade. Sequências não-redundantes foram alinhadas com o banco de dados de bactérias de referência SILVA, fornecido por Mothur (Quast *et al.*, 2012). Sequências quiméricas foram removidas. Sequências alinhadas foram classificadas filogeneticamente com base no banco de dados SILVA (Wang *et al.*, 2009). Sequências representativas das OTUs foram recuperadas a partir da distância entre as sequências de cluster e foram classificadas com base em SILVA, Green genes e taxonomias RDP (De Santis *et al.*, 2006; Quast *et al.*, 2012; Cole *et al.*, 2014). Finalmente, a tabela de OTUs foi filtrada para remover sequências pouco abundantes (sequências <0.001%) (de acordo com SILVA ou Green genes).

As análises foram conduzidas no programa PAST 3.14 (Hammer *et al.*, 2001) e no Microsoft Excel®. No PAST, os dados de todas as amostras foram normalizados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Procede-se então com uma Two-Way ANOVA, utilizando-se tempo e tratamento como fatores para gerar um gráfico de diversidade alfa com os índices de Shannon e Simpson. O teste a posteriori usado foi o de Tukey.

O Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (nMDS), baseado em Bray-Curtis, foi utilizado para testar o efeito do tratamento e do tempo na microbiota de ambas as espécies. A estatística aplicada foi a Análise Multivariada de Variância Permutacional, Two-way PERMANOVA.

No Excel®, foi construída uma curva de rarefação a fim de verificar se a cobertura das sequências havia sido satisfatória. Posteriormente, foi gerado um gráfico de colunas empilhadas a nível de Filo das bactérias. Para isso, consideramos a frequência relativa média de cada grupo de bactéria acima de 0,1% em diferentes tempos e tratamentos para cada espécie de esponja. Grupos de microrganismos com frequência abaixo de 0,1% foram agrupados e denominados como “outros”.

Para a construção da figura com os principais gêneros encontrados nas amostras, foram considerados todos os gêneros cuja abundância relativa média global fosse maior que 0,05%. Os gêneros foram então classificados em 6 categorias de acordo com sua abundância relativa e plotados em forma de bolhas com o auxílio da ferramenta online iTOL (<https://itol.embl.de>; Letunic & Bork, 2019). Todas as análises foram posteriormente editadas com auxílio do software Adobe Illustrator.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA TEMPERATURA

O monitoramento da temperatura mostrou uma diferença de cerca de 3,6 °C na média da temperatura entre o controle e o tratamento (Figura 4). Na Ilha do Bonfim, a temperatura mínima foi 24,4 °C, a média foi 28,9 °C (+/- 0,7) e a máxima foi 30,8 °C. Em Piraquara de Fora, a mínima foi 28,5°C, a média foi 32,5°C (+/- 1,4) e a máxima foi 35,7°C.

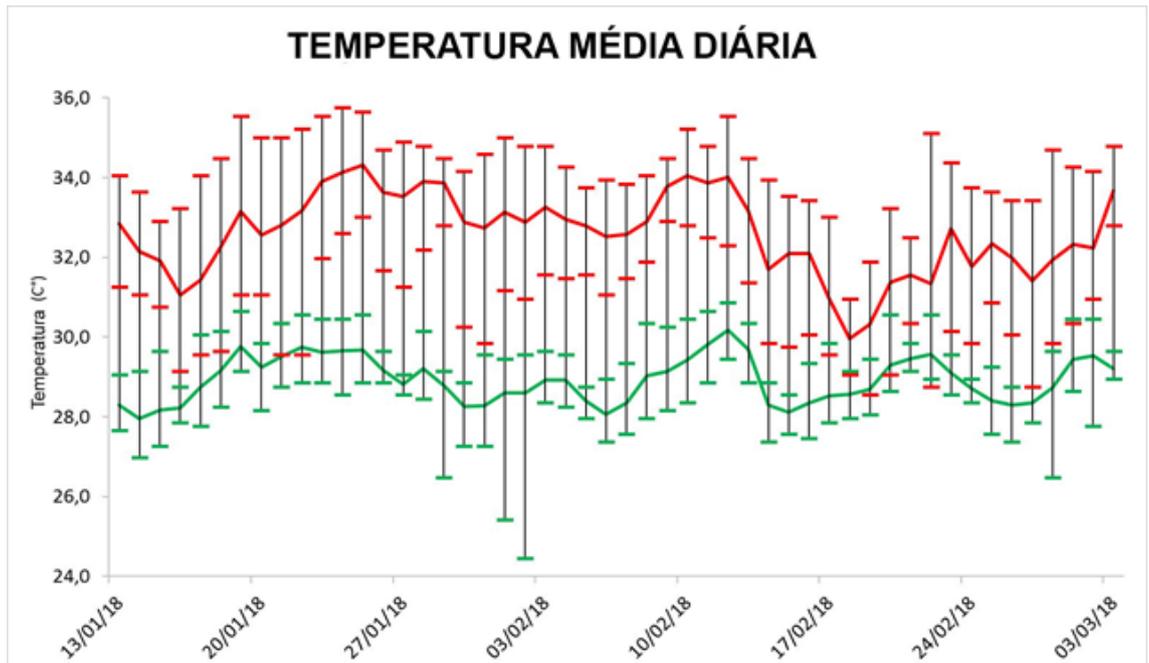


Figura 4. Variação da temperatura média diária com valores de mínima e máxima no controle (verde) e no tratamento com temperatura elevada (vermelho).

Controle

No T1 as esponjas de ambas as espécies permaneceram saudáveis. As esponjas regeneraram as partes perdidas em T0 e não apresentaram alteração na coloração nem na morfologia (Figura 5B; 6B). Entre o T1 e o T2 houve uma forte ressaca e, por isso, alguns indivíduos do controle foram perdidos. No T2 foram encontrados três indivíduos de *Amphimedon viridis* e quatro de *Chondrilla* aff. *nucula*. Todos os indivíduos permaneceram aparentemente saudáveis (Figura 5C; 6C).

Tratamento com temperatura elevada

Todos os indivíduos de *Amphimedon viridis* apresentavam-se cobertos de algas (Figura 5E) e levemente branqueados no T1. Além disso, apresentavam bolhas de gás aderidas ao corpo (Figura 5E). Já *Chondrilla* aff. *nucula* não apresentou nenhuma alteração em sua morfologia externa (Figura 6E).

Branqueamento severo foi registrado em quatro indivíduos de *Amphimedon viridis* no T2 (Figura 5F) e um indivíduo morreu. No entanto, dois indivíduos estavam aparentemente saudáveis, embora seu tamanho tivesse reduzido. Os indivíduos de *Chondrilla* aff. *nucula* e, T2 não apresentaram branqueamento, mas dois indivíduos tiveram sua morfologia alterada, ficando mais achatados, espreados na rocha (Figura 6E) e um indivíduo não foi encontrado.

No T2 foram re-encontrados sete indivíduos de *Amphimedon viridis* e quatro de *Chondrilla* aff. *nucula*.

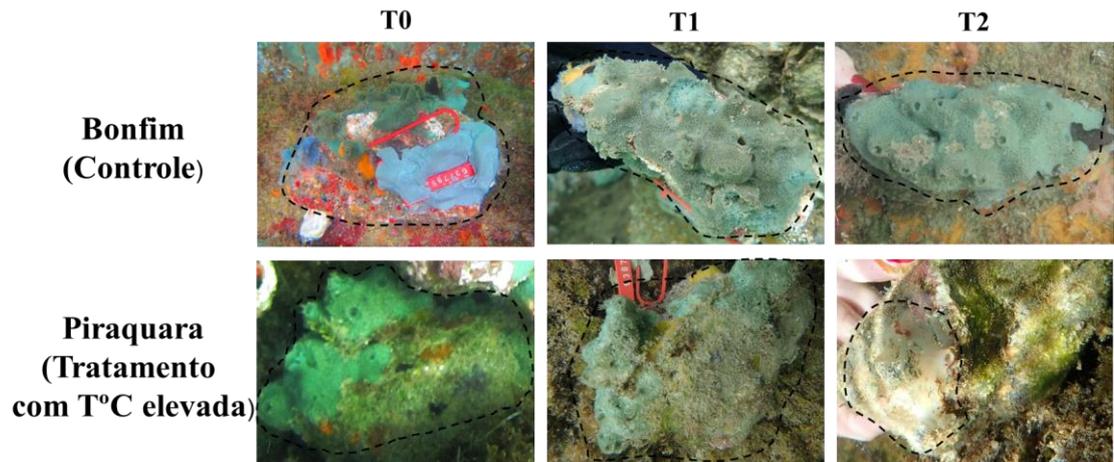


Figura 5. *Amphimedon viridis* no controle e no tratamento com temperatura elevada em T0, T1 e T2. A-C mostra o mesmo indivíduo do controle. D-F mostra o mesmo indivíduo do tratamento com temperatura elevada.

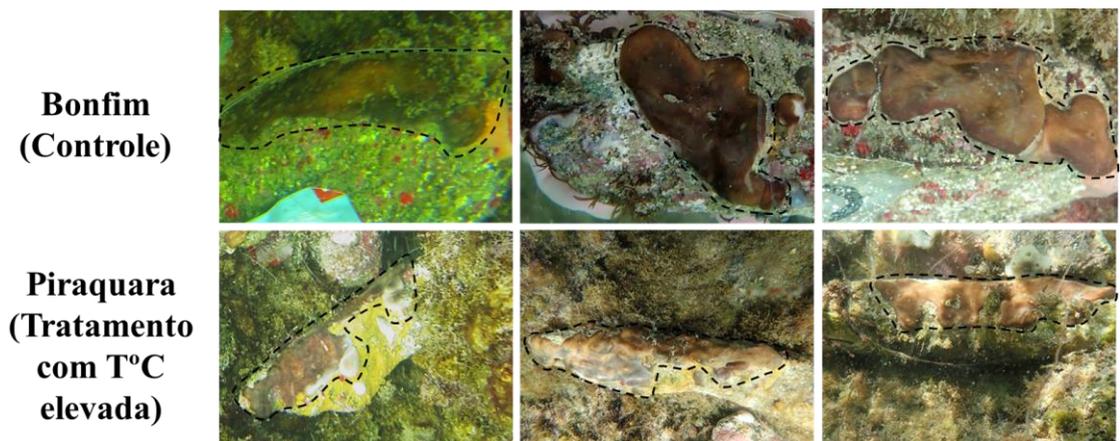


Figura 6. *Chondrilla* aff. *nucula* no controle e no tratamento com temperatura elevada em T0, T1 e T2. A-C mostra o mesmo indivíduo do controle. D-F mostra o mesmo indivíduo no tratamento da temperatura elevada.

4.2. ANÁLISE DA ÁGUA

Os testes para detecção de amônia, nitrito, nitrato e cloro deram zero tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada nos três tempos (T0, T1 e T2).

4.3. MICROBIOTA

O sequenciamento do 16S rRNA teve uma boa cobertura, o que pode ser observado na curva de rarefação (Figura 7).

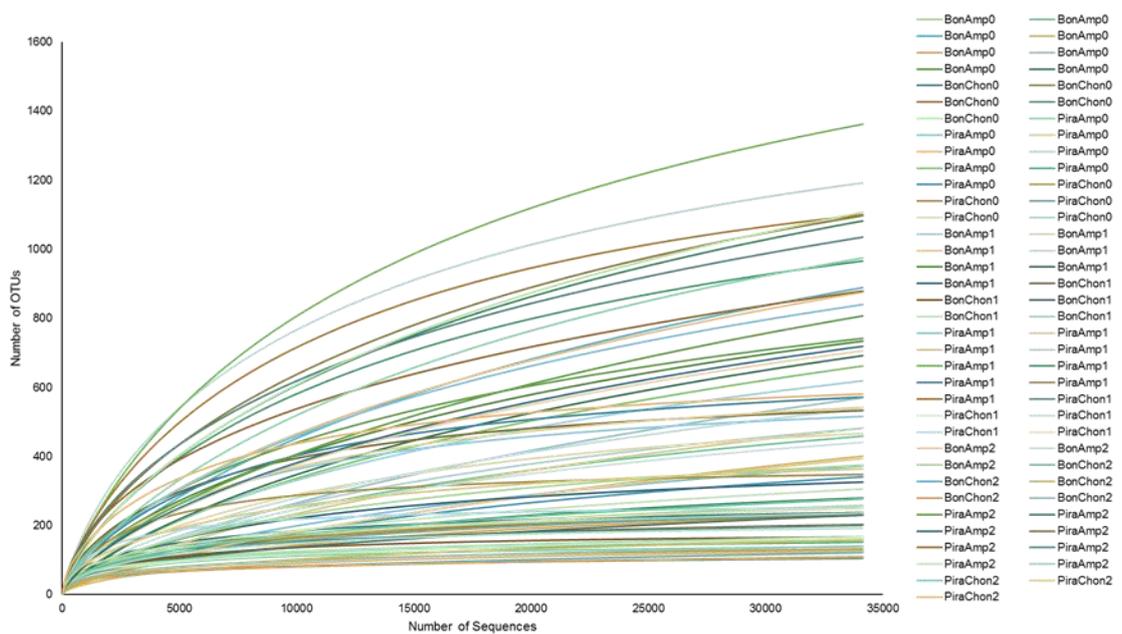


Figura 7. Curva de rarefação do gene 16S rRNA de todas as amostras sequenciadas. As linhas representam a riqueza de microrganismos de cada amostra.

Microbioma

Para determinar o microbioma central das esponjas, nós consideramos as OTUs que estavam presentes em todos os indivíduos de cada espécie, com abundância maior que 0,001%. O microbioma variável foi determinado por OTUs que estavam presentes em pelo menos um indivíduo, mesmo que em baixa abundância (>0,001%). O microbioma central de *Amphimedon viridis* é composto por sete filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, sendo o filo Proteobacteria (classe Gammaproteobacteria) o mais abundante (> 40% em todos os indivíduos; Tabela S1). *Chondrilla* aff. *nucula* apresentou o dobro de filos: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Dadabacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospinae, Nitrospirae, Patescibacteria, PAUC34f, Poribacteria e Proteobacteria, sendo Firmicutes o filo mais abundante (>30% em todos os indivíduos; Tabela S2).

Amphimedon viridis

Alterações significativas foram observadas com relação ao número de OTUs, índice de diversidade de Shannon e índice de Simpson nas esponjas sujeitas à temperatura elevada e controle, entre o T0 e T1 (Figura: 8A-C; ANOVA: $p = <0,05$). No controle, entre T1 e T2, houve uma tendência à recuperação da microbiota original (Tabela 1; Figura 8A-C), sugerindo que a alteração observada em T1 resultou apenas do estresse causado pela

manipulação das esponjas com a retirada de fragmentos de seu corpo. Já no tratamento com temperatura elevada, houve uma intensificação dessa alteração (Tabela 1; Figura 8A-C).

Tabela 1. Média e desvio-padrão do número de OTUs, Índice de Shannon e Simpson de *Amphimedon viridis* no controle e no tratamento de temperatura elevada.

			OTUs		Shannon (H')		Simpson	
			média	dp	média	dp	média	dp
<i>Amphimedon viridis</i>	Controle	T0	478,6	239,8	1,7	0,5	0,4	0,1
		T1	538,7	152,4	2,1	0,3	0,3	0,1
		T2	507,3	175,2	1,9	0,1	0,4	0
	Temperatura elevada	T0	344,6	195,1	1,5	0,3	0,5	0,1
		T1	830,4	351,4	2,7	0,6	0,3	0,1
		T2	962,6	145,9	3	0,6	0,2	0,1

dp= desvio padrão

Já nos indivíduos submetidos ao tratamento com temperatura alta, houve intensificação na alteração da microbiota mesmo em T2 (Tabela 1; Figura 8A-C). Houve diferença significativa da microbiota entre o controle e o tratamento de temperatura elevada, tanto no número de OTUs como no índice de diversidade de Shannon (Figura 8A e C; ANOVA: $p < 0,05$).

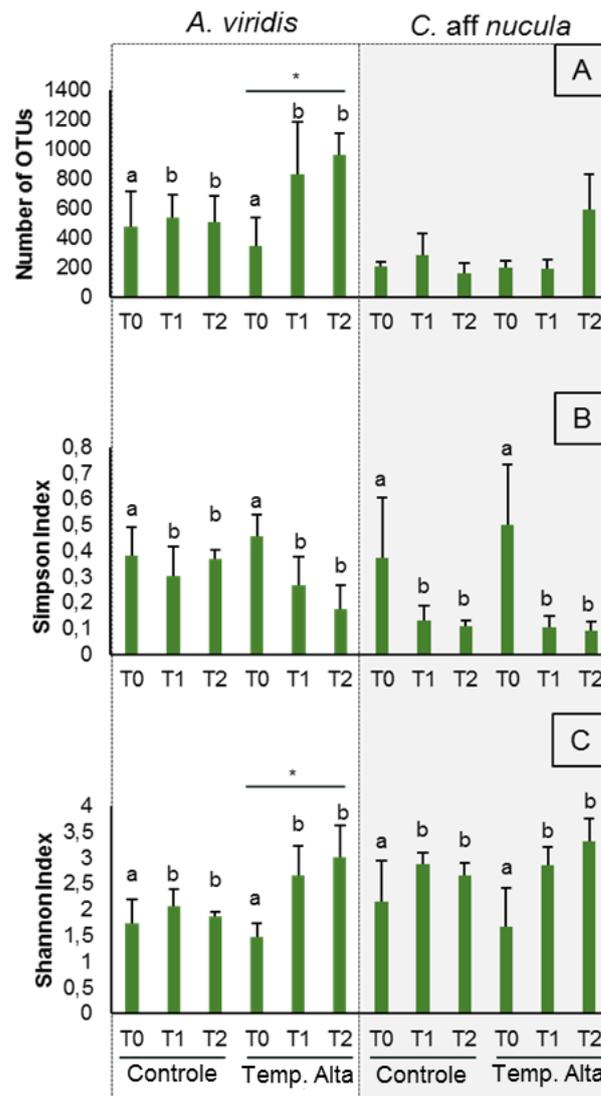


Figura 8. Diversidade alfa de *Amphimedon viridis* e *Chondrilla aff. nucula*. Os asteriscos representam diferenças significativas entre o controle e o tratamento com temperatura elevada. As letras indicam diferenças significativas entre os tempos, independentemente de ser controle ou tratamento.

No nMDS, a microbiota de *Amphimedon viridis* no T0 foi igual tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada, como esperado (Figura 9B). Porém, diferiu nos demais tempos, ou seja, no início do experimento todos os indivíduos apresentavam a mesma microbiota, mas em sete dias (T1), a comunidade microbiana apresentou alterações tanto nos espécimes submetidos a temperaturas elevadas como nos espécimes do controle (PERMANOVA: $p=0,0015$). No entanto, as mudanças na microbiota foram mais intensas no tratamento com temperatura alta (PERMANOVA: $p=0,0002$). No T2, a microbiota do controle permaneceu igual à do T1, ou seja, após a mudança inicial, não teve mais nenhuma mudança significativa no controle (PERMANOVA: $p=0,14$). Já em T2 no tratamento com temperatura alta, a microbiota variou ainda mais (PERMANOVA: T1-T2: $p=0,02$; T0-T2:

$p=0,0002$), indicando que a temperatura alta continuou atuando na transformação da comunidade microbiana até esta ficar distinta da microbiota do estado inicial (Figura 9B).

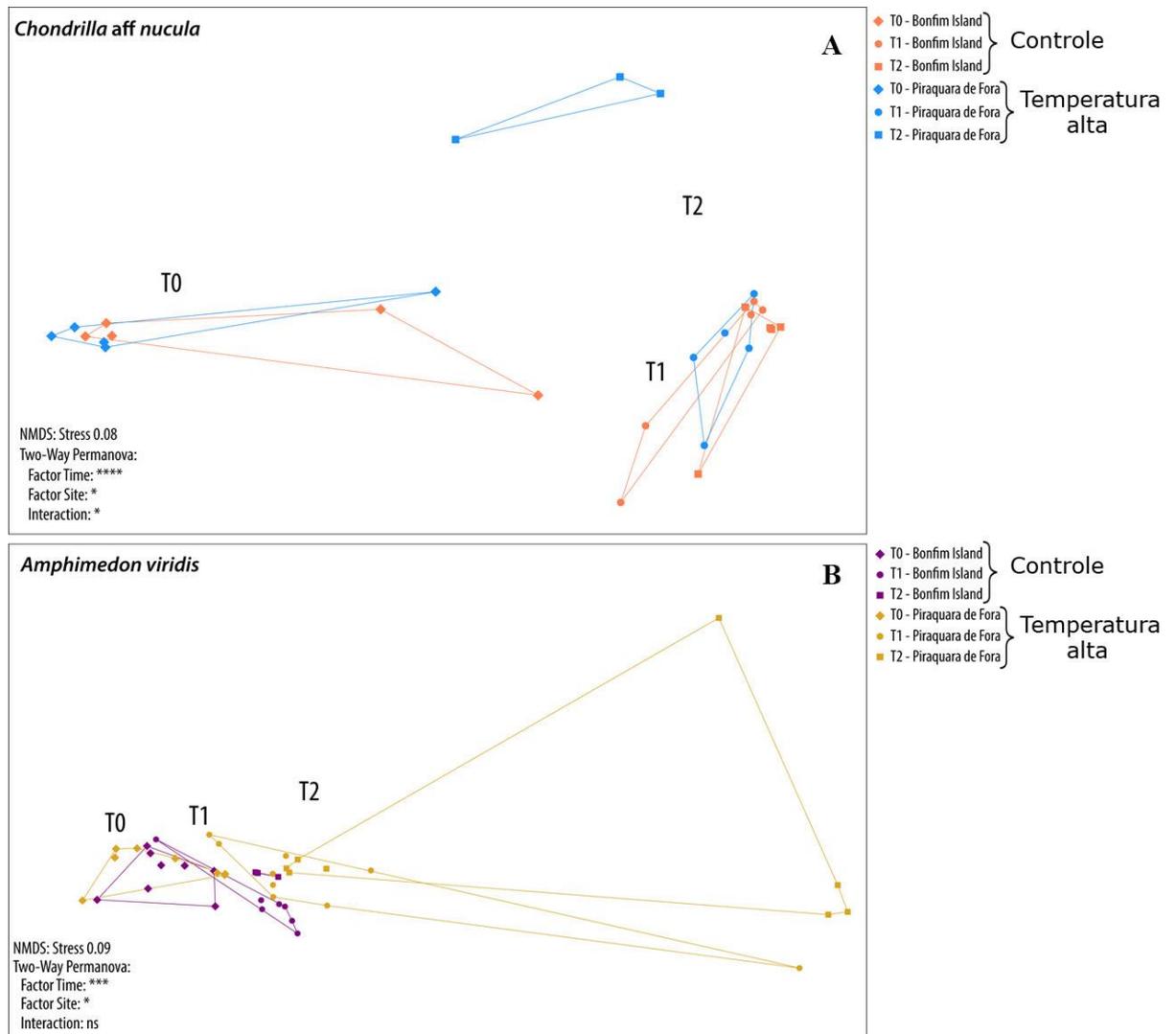


Figura 9. nMDS de cada espécie baseado em Bray-Curtis, mostrando a similaridade das comunidades de microrganismos de cada indivíduo do controle e do tratamento com temperatura alta e entre os tempos. **A.** *Chondrilla aff. nucula*, Stress= 0,08. **B.** *Amphimedon viridis*, Stress = 0,09.

Analisando os grupos de bactérias das esponjas e sua abundância de filos no controle e no tratamento com temperatura alta de T0 para T1, a principal diferença observada foi a redução de Firmicutes, (controle: T0 = 18,7%, T1 = 3,4%; temperatura elevada T0= 14,1%, T1 = 2,4%) e o aumento de Cyanobacteria (controle: T0 = 14,0%, T1 = 34,9%; temperatura elevada: T0 = 13,6%, T1 = 28,7%) e de Actinobacteria (controle: T0 = 2,4%, T1 = 6,9%; temperatura elevada: T0 = 2,1%, T1 = 4,3%) (Figura 10). Além disso, no tratamento com temperatura elevada é possível ver o aumento de Bacteroidetes (T0 = 0,3%, T1 = 2,0%) e Planctomycetes (T0 = 0,3%, T1 = 2,4). O filo Proteobacteria, apesar de ter apresentado uma redução tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada, manteve sua

dominância (Controle: T0 = 62,7%, T1 = 53,5%, Temperatura elevada: T0 = 69,3%, T1 = 57,4%) (Figura 10).

Em T2, no controle, o filo Firmicutes continuou apresentando redução (T1 = 3,4%, T2 = 0,2%). Actinobacteria, que tinha aumentado sua frequência em T1 (6,9%), reduziu para 3,6% em T2 e Cyanobacteria caiu de 34,9% no T1 para 30,9% no T2, mas mesmo assim ainda continuou com abundância superior ao T0 (14,0%). Já no tratamento com temperatura elevada, Cyanobacteria continuou aumentando sua abundância (T1 = 28,7%, T2 = 33,8%). Firmicutes também continuou reduzindo sua abundância (T1 = 2,4%, T2 = 0,7%) e Actinobacteria, diferente do que aconteceu no controle, aumentou no tratamento com temperatura alta de 4,3% (T1) para 6,2% (T2). Bacteroidetes triplicou sua abundância do T1 para o T2 (2,0% para 6,5%) e Planctomycetes manteve semelhante sua abundância (T1 = 2,4%, T2 = 2,0%). Proteobacteria, tanto no controle como no tratamento com temperatura alta, manteve sua dominância, porém, apresentou aumento no controle (T1 = 53,5%, T2 = 62,4%, este parecido com o T0 = 62,7%) e redução no tratamento com temperatura elevada (T1 = 57,4%, T2 = 48,9%).

Na dinâmica da microbiota a nível de gênero (Figura 11), houve uma redução de *Staphylococcus* tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada (T0 = 10-20%, T1 = 5-1%, T2 < 1%). *Synechococcus* manteve sua abundância de 10-20% durante todo o experimento tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada, exceto pelo T1 do controle, onde houve um aumento de 10-20% para 20-30%. No entanto, em T2, sua abundância era novamente de 10-20%. *Cyanobium PCC-6307* teve sua abundância aumentada de 1-5% para 5-10% em T2 no controle e, a partir de T1, no tratamento com temperatura elevada. Algumas mudanças pontuais ocorreram, como o aumento de *Ruegeria* no tratamento com temperatura elevada no T1. *Anoxybacillus* aumentou apenas no controle no T2 e *Arenicella* e *Clade Ia* aumentou somente no T2 no tratamento com temperatura alta. Todas essas mudanças pontuais foram de menos de 1% para 1-5% (Figura 11).

Estatisticamente, as mudanças que ocorreram em *Amphimedon viridis*, no tratamento com temperatura elevada foram significativas entre T0 e T2 (ANOVA/TUKEY: $p < 0,05$) para 28 OTUs diferentes (Tabela 3). Uma das mudanças mais visíveis foi a redução da OTU da Família EC94, pertencente à classe Gammaproteobacteria ($p=0,0003$), que compunha o microbioma central de *A. viridis*. Além disso, 17 OTUs que já estavam presentes no T0, independentemente da sua abundância ou prevalência nos indivíduos, tiveram sua frequência aumentada (Tabela 3). Adicionalmente, oito OTUs surgiram no tratamento com temperatura elevada, com frequência e prevalência variando entre os indivíduos (Tabela 3). Essas OTUs

foram: Flavobacteriaceae ($p=0,002$), três OTUs de SAR116 clade ($p=0,0006$), Rhodovibrionales ($p=0,0006$), Rickettsiales ($p=0,0006$) e duas OTUs do gênero *Arenicella* (ambas $p=0,0007$).

Chondrilla aff. *nucula*

Em relação ao número de OTUs não houve nenhuma variação estatisticamente significativa nem entre o controle e o tratamento de aumento da temperatura ($p=0,2$), nem entre os tempos (Figura 8A; $p=0,9$). No entanto, a principal alteração se deu pela perda da dominância, o que foi observado pelo índice de Simpson nos tempos T0 e T1, tanto no controle como no tratamento com alta temperatura (Tabela 2; figura 8B; $p=0,001$). Além disso, o índice de Shannon também mostrou variação significativa entre o T0 e T1 tanto no controle como no tratamento com alta temperatura (Tabela 2; figura 8C; $p=0,003$). A partir do T1, não houve mais nenhuma diferença significativa, porém, essa espécie, da mesma forma que *Amphimedon viridis*, apresentou uma tendência de recuperação no controle e uma acentuação dos efeitos no tratamento com temperatura elevada, como mostra índice de Shannon e o número de OTUs (Tabela 2; Figura 8A, C).

Tabela 2. Média e desvio-padrão da diversidade de OTUs, Índice de Shannon e Simpson de *Chondrilla* aff. *nucula*: controle e tratamento com temperatura elevada.

			OTUs		Shannon (H')		Simpson	
			média	dp	média	dp	média	dp
<i>Chondrilla</i> aff. <i>nucula</i>	Controle	T0	205,8	31,8	2,2	0,8	0,4	0,2
		T1	281	152	2,9	0,2	0,1	0,1
		T2	161,6	67,1	2,7	0,2	0,1	0
	Temperatura elevada	T0	200,6	49,3	1,7	0,7	0,5	0,2
		T1	193,2	61,9	2,9	0,4	0,1	0
		T2	595	238,3	3,3	0,4	0,1	0

dp= desvio padrão

A microbiota de *Chondrilla* aff. *nucula* no T0 apresentou a mesma tendência que a microbiota de *A. viridis* no nMDS, ou seja, as microbiotas foram iguais tanto no T0 do controle como no T0 do tratamento com temperatura elevada (PERMANOVA: $p=0,5$), o que já era esperado, uma vez que o T0 do tratamento correspondia às esponjas coletadas ao mesmo tempo na Ilha do Bonfim e então transplantadas para Piraquara de Fora (tratamento) (Figura 9A). Comparando-se os tempos ao longo do experimento (T0, T1 e T2), então sim houve variação na microbiota (Figura 9A; PERMANOVA: $p=0,0001$). A alteração de todos

os indivíduos entre T0 e T1 mostra que a transformação sofrida nos primeiros sete dias do experimento resultou de um processo sistêmico, independente do tratamento. No controle, T1 e T2 foram iguais, mostrando que após o estresse inicial da manipulação das esponjas, elas não sofreram mais nenhuma alteração (PERMANOVA $p=0,4$). O mesmo foi observado em *A. viridis*. No tratamento com temperatura elevada, a microbiota de T2 também sofreu alteração como *A. viridis*, mas de maneira mais branda (Figura 9A; PERMANOVA: T0-T2 e T1-T2: $p=0,01$).

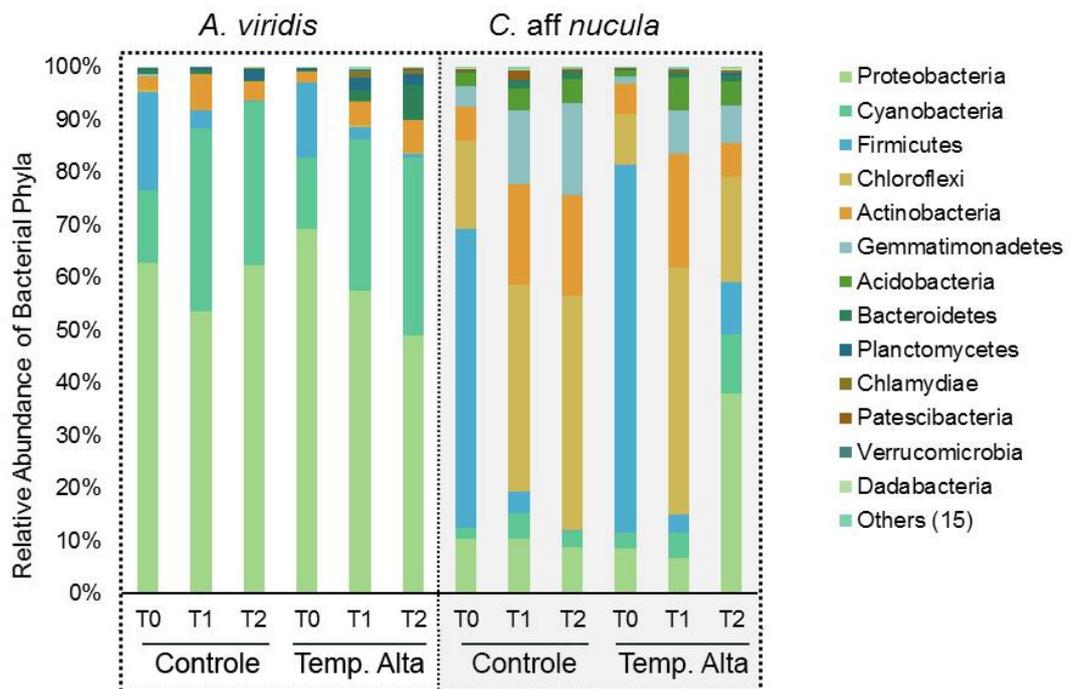


Figura 10. Abundância relativa dos filios de bactérias e cianobactérias em *Amphimedon viridis* e *Chondrilla aff. nucula*.

As transformações também puderam ser analisadas pelo gráfico de colunas empilhadas (Figura 10), indicando os filios de bactérias presentes em cada tempo no controle e no tratamento com temperatura elevada. De T0 para T1, a mudança mais notável foi a perda de dominância do filo Firmicutes, tanto no controle como no tratamento com temperatura elevada (controle: 56,7% para 4,1%; temperatura elevada: 70,1% para 3,4%) (Figura 10). Além disso, houve um aumento considerável no controle e no tratamento com temperatura elevada de Chloroflexi (controle: 16,9% para 39,4%; temperatura elevada: 9,7% para 47,0%), Actinobacteria (controle: 6,2% para 19%; temperatura elevada: 5,6% para 21,7%) e Gemmatimonadetes (controle: 3,9% para 14,1%; temperatura elevada: 1,4% para 8,2%) (Figura 10). Cyanobacteria apresentou um aumento relativamente menor em relação aos outros filios (controle: 2,2% para 4,7%; temperatura elevada: 3,9% para 4,9%) (Figura 10).

Proteobacteria, por sua vez, praticamente não aumentou sua abundância no controle (10,3% para 10,4%), porém, apresentou uma pequena redução no tratamento com temperatura elevada (8,5% para 6,7%).

Em T2, no controle, Firmicutes baixou de 4,1% para 0,2%, Cyanobacteria reduziu de 4,7% para 3,0% e Proteobacteria de 10,4% para 8,9%. Chloroflexi e Gemmatimonadetes continuaram aumentando sua frequência de 39,4% para 44,4% e de 14,1% para 17,4%, respectivamente. Actinobacteria permaneceu com sua frequência em 19%. Na temperatura elevada, o filo Proteobacteria foi o mais abundante, passando de 6,7% para 38,0%, seguido por Chloroflexi, que apesar de ter tido sua abundância reduzida de 47% para 20,1%, foi o segundo mais abundante. Cyanobacteria também teve um aumento de 4,9% para 11,1%, junto com Firmicutes (3,4% para 9,9%). Actinobacteria e Gemmatimonadetes reduziram de 21,7% para 6,2% e de 8,2% para 7,2%, respectivamente.

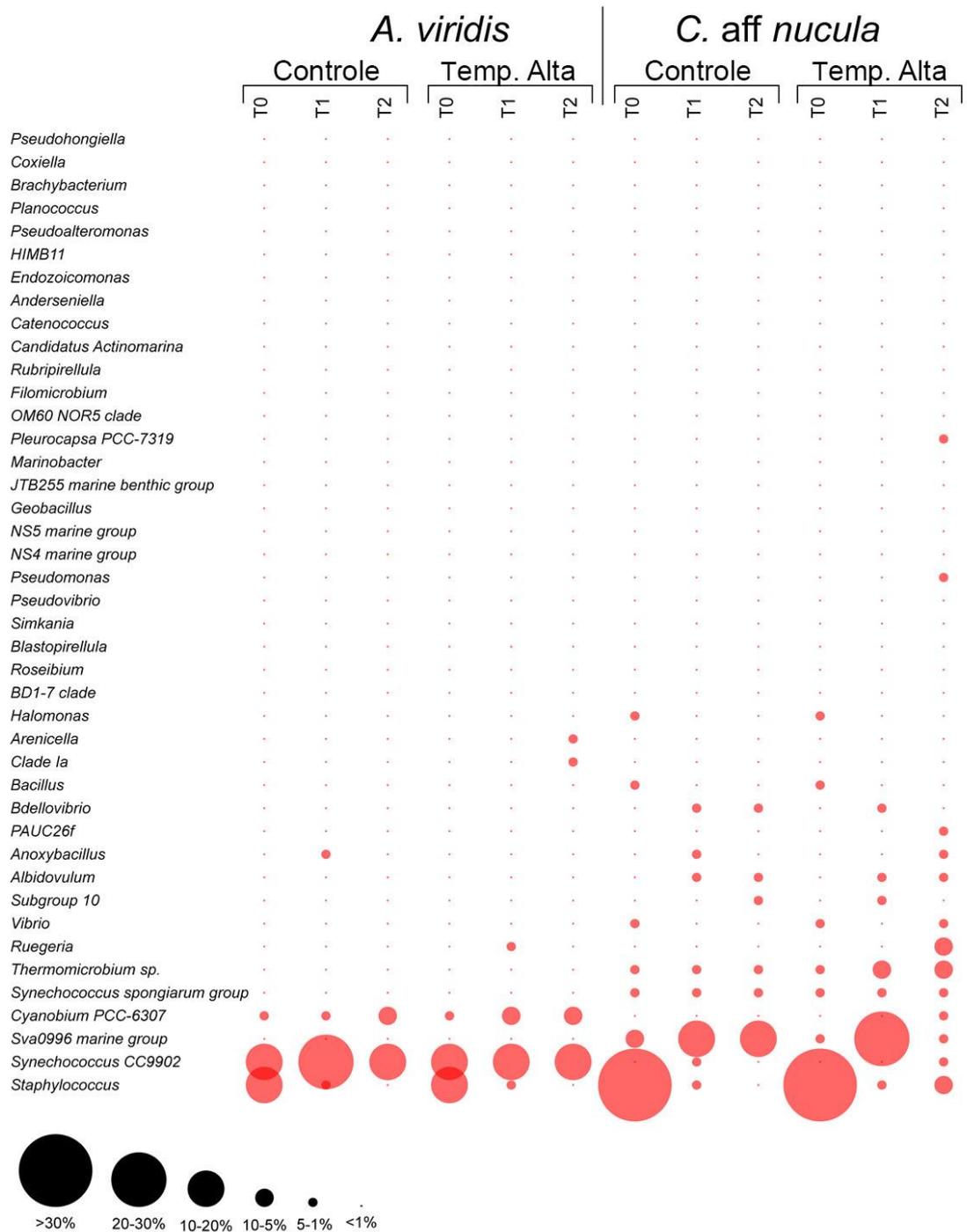


Figura 11. Abundância dos gêneros de bactérias. Informação fornecida separadamente por espécie de esponja, tempo e tratamento.

Tabela 3. Diferenças estatísticas na comunidade bacteriana de *Chondrilla* aff. *nucula* e *Amphimedon viridis* entre o T0 e T2 no tratamento de temperatura elevada.

<i>Chondrilla</i> aff. <i>nucula</i>						TRATAMENTO T0					TRATAMENTO T2											
X.OTU.ID	Filo	Classe	Ordem	Família	Genero	TUKEY (p)																
Otu35	Acidobacteria	Acidobacteria	Soilbacterales	Soilbacteraceae (Subgroup 3)	<i>PAUC26f</i>	0,01	46	286	9	74	14											
Otu18	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	uncultured	1x10 ⁻⁷	4	367	45	10	91			8428	1438	1147						
Otu48	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Albidovulum</i>	1x10 ⁻⁷	3	154	63	12	18			12146	24679	11334						
Otu24	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i>	1x10 ⁻⁷	76	871	121	3	11			1163	3427	2418						
														18996	3893	5845						
<i>Amphimedon viridis</i>						TRATAMENTO T0					TRATAMENTO T2											
X.OTU.ID	Filo	Classe	Ordem	Família	Genero	TUKEY (p)																
Otu122	Actinobacteria	Acidimicrobia	Microtrichales	Ilumatobacteraceae	uncultured	0,01	0	3	9	0	2	0	2	2	77	295	64	593	495	403	30	
Otu124	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium</i>	0,014	25	3	12	15	8	8	22	7	1	0	0	2	446	15	1	
Otu107	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	uncultured	0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	62	720	85	896	792	790	18	
Otu108	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	uncultured	0,002	0	3	9	0	0	0	0	2	51	693	119	661	864	692	26	
Otu45	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	uncultured	0,002	0	1	1	0	0	1	0	0	150	2886	227	3340	2764	2808	36	
Otu71	Chlamydiae	Chlamydiae	Chlamydiales	Simkaniaceae	<i>Simkania</i>	0,0004	0	0	0	0	0	2	0	0	236	117	492	1105	403	305	362	
Otu102	Planctomycetes	Planctomycetacia	Prellulales	Prellulaceae	uncultured	0,002	8	1	3	0	0	7	20	3	255	68	355	349	137	85	279	
Otu49	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116 clade	uncultured alpha proteobacterium	0,0006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	10658	649	0	0	
Otu195	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116 clade	uncultured bacterium	0,0006	0	11	15	0	1	0	0	11	11	82	24	274	236	245	6	
Otu31	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116 clade	uncultured bacterium	0,0006	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	10247	5196	9553	0	
Otu82	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116 clade	uncultured alpha proteobacterium	0,0006	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	4999	36	3	0	
Otu86	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Puniceispirillales	SAR116 clade	uncultured alpha proteobacterium	0,0006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3703	510	0	0	
Otu123	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	HIMB11	0,0006	0	9	11	0	1	1	0	9	51	282	49	485	759	686	12	
Otu158	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i>	0,0006	0	13	5	0	0	8	0	9	20	191	24	211	369	355	14	
Otu39	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	AEGEAN-169 marine group	uncultured bacterium	0,0006	33	206	243	121	2	19	28	77	115	925	261	2639	2350	2030	28	
Otu699	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodovibrionales	Kiloniellaceae	uncultured	0,0006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	148	0	0	0	0	0	
Otu58	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	AB1	uncultured organism	0,0006	0	0	0	0	0	0	0	0	22	6893	129	195	206	181	14	
Otu94	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11 clade	Clade I	<i>Clade Ia</i>	0,0006	0	59	53	12	0	10	15	27	9	101	71	611	465	327	9	
Otu105	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11 clade	Clade I	<i>Clade Ia</i>	0,0006	0	78	63	5	5	14	0	28	10	48	90	396	348	206	5	
Otu109	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11 clade	Clade I	<i>Clade Ia</i>	0,0006	0	72	109	0	0	12	1	27	3	69	49	421	354	204	6	
Otu116	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11 clade	Clade I	<i>Clade Ia</i>	0,0006	0	120	114	5	2	21	0	29	7	64	69	400	321	228	2	
Otu1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	EC94	uncultured bacterium	0,0003	42378	41260	74848	102117	55779	48692	59160	54483	61154	38	66051	128	65	43	45739	
Otu151	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Methylophilaceae	OM43 clade	0,0005	0	5	16	34	3	13	0	16	29	84	173	242	338	177	109	
Otu61	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Arenicellales	Arenicellaceae	<i>Arenicella</i>	0,0007	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8137	0	1	12	0	0	
Otu79	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Arenicellales	Arenicellaceae	<i>Arenicella</i>	0,0007	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5227	0	1	6	0	0	
Otu84	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	EC94	uncultured bacterium	0,0005	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4376	0	3	0	2	0	
Otu85	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0,0005	0	7	16	11	0	23	0	0	0	0	0	0	0	667	9	1
Otu88	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	EC94	uncultured bacterium	0,0005	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3699	3	0	1	0	0	

Mudanças na microbiota a nível de gênero entre os tratamentos também foram perceptíveis. A perda de dominância vista anteriormente no gráfico de diversidade alfa (Figura 8B) e a redução do filo Firmicutes no gráfico de abundância (Figura 10), refere-se ao gênero *Staphylococcus*, que em T0 tinha abundância maior que 30%, mas que a partir de T1 teve redução na sua abundância para 1-5% (Figura 11). No T2, em temperatura alta, sua abundância subiu para 5-10%, mas no controle, diminuiu para menos de 1%. O gênero *Sva0996 marine group* teve um aumento a partir de T1 nos dois tratamentos. No controle, aumentou de 5-10% para 10-20% e se manteve assim em T2 (Figura 11). Já em temperatura elevada, aumentou de 1-5% para 20-30% no T1, mas voltou para 1-5% no T2. *Halomonas* e *Bacillus* estavam presentes entre 1-5% no T0, mas a partir de T1 tanto no controle como em temperatura elevada sua frequência diminuiu para menos de 1%. Os gêneros *Pleurocapsa PCC-7319*, *Pseudomonas*, *PAUC26f*, *Ruegeria* e *Cyanobium PCC-6307* tiveram sua frequência aumentada apenas em temperatura elevada e no T2 (Figura 11). No entanto, as mudanças foram significativas apenas para quatro OTUs: gênero *Pauc26f* ($p=0,01$) e três OTUs da família Rhodobacteraceae (*Albidovulum*, *Ruegeria* e bactéria não-cultivada $p=1 \times 10^7$). Essas quatro OTUs já estavam presentes em T0, mas sua abundância foi maior no tratamento com temperatura elevada (Tabela 3).

5. DISCUSSÃO

A exposição a temperaturas elevadas resultou na modificação da microbiota de *Amphimedon viridis* e de *Chondrilla* aff. *nucula* e em alterações morfológicas, principalmente em *A. viridis*, sugerindo uma maior sensibilidade desta espécie ao aumento da temperatura.

5.1. MICROBIOMA

Apesar da microbiota de *A. viridis* ser desconhecida na literatura, já se conhece a microbiota de outras três espécies do gênero: *A. compressa* (Potens, 2016), *A. erina* (Thomas et al., 2016) e *A. queenslandica* (Gauthier et al., 2016). Apesar dessas três espécies e de *A. viridis* terem sido coletadas em localidades bastante distintas (*A. compressa*: Flórida; *A. erina*: Caribe; *A. queenslandica*: Austrália; *A. viridis*: Brasil), suas microbiotas apresentaram semelhanças. Em todas elas, Proteobacteria foi o filo mais abundante, sendo Gammaproteobacteria a classe mais numerosa. Esse resultado pode ser um indicativo de que a microbiota de *Amphimedon* seja conservada, tendo Gammaproteobacteria como classe mais comum no gênero. Apesar dessa semelhança entre elas, alguns filios variaram entre as

espécies. Em *A. queenslandica*, por exemplo, a segunda OTU mais abundante pertence à classe Betaproteobacteria, enquanto em *A. compressa* o segundo filo mais comum foi Cyanobacteria e em *A. viridis* foi Firmicutes e então Cyanobacteria. Todos os demais filios que compõem a microbiota central de *A. viridis* não foram citados para *A. queenslandica* (Gauthier *et al.*, 2016), mas foram encontrados em *A. compressa* e *A. erina* (Thomas *et al.*, 2016). Não é possível afirmar se esses filios também fazem parte do microbioma central dessas espécies, pois o objetivo daquele trabalho foi analisar o perfil dos simbiontes da esponja e não determinar o microbioma central das mesmas. Analisando-se a abundância média relativa dos filios bacterianos observados em *A. compressa* e em *A. erina*, o que difere é a abundância dos filios Actinobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes e da classe Gammaproteobacteria, que foi maior em *A. viridis*.

A comunidade bacteriana de *A. viridis* também foi composta por outros filios, presentes apenas em alguns indivíduos e, por isso, considerados parte do microbioma variável da espécie. *Amphimedon viridis* apresentou os filios Chlamidiae, Acidobacteria, Dadabacteria, Gemmatimonadetes, Marinimicrobia (SAR406 clade), Verrucomicrobia, Epsilonbacteraeota e Deinococcus-Thermus. Os filios Chlamidiae, Acidobacteria, Gemmatimonadetes e Verrucomicrobia também foram verificados em *A. compressa* e em *A. erina* (Thomas *et al.*, 2016), mas não em *A. queenslandica*. Já os filios Marinimicrobia (SAR406 clade), Epsilonbacteraeota, Dadabacteria e Deinococcus-Thermus foram encontrados apenas em *A. viridis*. Thomas e colaboradores (2016) verificaram o perfil da microbiota de 81 espécies de esponjas e, curiosamente, em nenhuma das espécies estudadas esses filios foram encontrados. Isso pode ser um indicativo de que a microbiota variável seja proveniente da água do mar (transmissão horizontal), ou ainda que *A. viridis* tenha evoluído separadamente a sua microbiota.

Não há também nenhuma informação na literatura sobre a microbiota de *C. aff. nucula* (Brasil), porém, há informações sobre a microbiota de espécimes identificados como *C. nucula* da Flórida (Hill *et al.*, 2006) e do Mediterrâneo (Thiel *et al.*, 2007). Nesses espécimes, houve a prevalência de Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Proteobacteria (classe Gammaproteobacteria). Além disso, Thiel e colaboradores (2007) também verificaram a presença de Actinobacteria, Deltaproteobacteria, Chloroflexi e Gemmatimonadetes. Todos esses filios também foram encontrados no microbioma central de *C. aff. nucula* no presente trabalho, além dos filios Dadabacteria, Firmicutes, Poribacteria, PAUC34, Patescibacteria, Nitrospinae e Nitrospirae. Outras espécies do gênero *Chondrilla*, como *C. australiensis* e *C. caribensis*, também apresentaram os filios PAUC34f, Poribacteria e Nitrospinae (Thomas *et*

al., 2016). Adicionalmente, o filo Firmicutes, encontrado em *C. caribensis* com abundância relativa de 0,001%, teve sua frequência muito maior em *C. aff. nucula* (64%). Além disso, os filos Dadabacteria, Nitrospinae e Patescibacteria não foram relatados para essas outras espécies do gênero *Chondrilla*, sendo possivelmente filos que são específicos da espécie brasileira. Em contraste, o microbioma variável de *C. aff. nucula* foi composto apenas pelo filo Verrucomicrobia. Esse filo também já foi encontrado em *C. australiensis* e *C. caribensis* (Thomas *et al.*, 2016), mas não foi citado para a espécie *C. nucula* da Flórida e do Mediterrâneo (Hill *et al.*, 2006; Thiel *et al.*, 2007).

A similaridade encontrada entre a microbiota de *C. aff. nucula* e de *Chondrilla caribensis* é muito interessante, uma vez que *C. nucula* compreende um complexo de espécies crípticas que foram separadas em cinco clados distintos no Atlântico Tropical Ocidental, podendo então representar cinco espécies diferentes (Klautau *et al.*, 1999). Até o momento, o que se sabe é que a verdadeira *C. nucula* ocorre no Mediterrâneo, sua localidade tipo (Mar Adriático). Porém, por se tratar de um complexo de espécies com poucos caracteres morfológicos e podendo apresentar plasticidade, a identificação morfológica dessas espécies fica limitada. Talvez uma análise detalhada da microbiota desse complexo possa auxiliar na separação de suas espécies.

Esses resultados indicam que o microbioma central de *C. aff. nucula* é mais diverso do que o de *A. viridis*. Por outro lado, *C. aff. nucula* apresentou um filo variável, enquanto *A. viridis* apresentou sete. Esses resultados sugerem que a espécie *A. viridis* possa abrigar mais microrganismos oriundos do ambiente do que *C. aff. nucula*. Isso indicaria que o microbioma de *A. viridis* poderia ser mais suscetível a mudanças ambientais do que o de *C. aff. nucula*.

5.2. EFEITO DA TEMPERATURA ELEVADA NO HOLOBIONTE ESPONJA

Amphimedon viridis sofreu forte reestruturação em sua microbiota quando transplantada para a localidade com temperatura elevada. Essa reestruturação foi caracterizada principalmente pelo aumento na diversidade e redução na dominância da sua comunidade microbiana (Figura 6). O aumento da diversidade bacteriana em esponjas pode resultar de uma resposta da microbiota ao estresse ambiental e pode estar associado com um aumento de bactérias oportunistas, que antes estavam ausentes ou presente em quantidades muito baixas na esponja (Webster & Taylor, 2012; Pita *et al.*, 2018). Além disso, o aumento da diversidade das comunidades microbianas tem sido descrito para esponjas doentes (Webster & Taylor, 2012; Sweet *et al.*, 2015) e também para corais (Zaneveld *et al.*, 2017; Ziegler, 2019). As

mudanças na microbiota de *A. viridis* no tratamento com temperatura elevada se deram pela diferença significativa de 28 OTUs, que foram caracterizadas principalmente pela redução de Gammaproteobacteria, que é a classe mais numerosa do microbioma central, além do aumento da classe Alphaproteobacteria. Ambas as modificações foram significativas (ANOVA: $p= 0,0003$ e $p= 0,0006$, respectivamente). Essa mudança na microbiota já foi observada em *Amphimedon compressa*, apresentando a doença “sponge white patch” na Flórida (Angermeier *et al.*, 2012). Outras alterações na microbiota se deram pelo aumento significativo dos filos Bacteroidetes (ANOVA: $p= 0,002$) e Actinobacteria (ANOVA: $p=0,01$), que também já foram associados a tecidos doentes de esponjas (Angermeier *et al.*, 2012; Webster & Taylor, 2012; Sweet *et al.*, 2015). Interessantemente, esses dois filos foram considerados parte do microbioma central de *A. viridis*. Isso pode ser considerado um indicativo de que durante um evento de perturbação possa haver um desequilíbrio nessa relação microrganismo-hospedeiro, fazendo com que bactérias da própria microbiota da esponja possam aumentar sua abundância, ou seja, o estresse poderia induzir a disbiose (Pita *et al.*, 2018).

Além dessas alterações, houve também o surgimento de oito OTUs em indivíduos diferentes que não haviam sido observadas no T0 do tratamento com temperatura elevada. Esse tipo de alteração pode ser explicado pelo princípio de Anna Karenina (Zaneveld *et al.*, 2017). Esse princípio propõe que enquanto as condições ambientais são adequadas, a microbiota é estável, tornando-se diferente de maneira estocástica, individualmente, quando sujeita a perturbações, no presente caso, ao aumento da temperatura. Ou seja, não se espera que as mudanças na microbiota das esponjas sujeitas ao aumento de temperatura sejam idênticas.

Morfologicamente, *Amphimedon viridis* apresentou intenso branqueamento e redução de tecido em 50% dos indivíduos e morte de um deles (Figura 5). Não podemos afirmar nesse trabalho se a causa dessa alteração morfológica foi uma consequência de infecção polimicrobiana após a disbiose, ou se de fato teve alguma bactéria patogênica responsável por esse distúrbio. Para mostrar qual microrganismo seria responsável por essa "doença", seria necessário seguir o postulado de Koch, que afirma que: 1) o microrganismo deve estar sempre associado à doença; 2) o microrganismo deve ser isolado de uma amostra infectada e cultivado; 3) a cultura deve induzir a doença quando inoculada em um animal saudável; e 4) o microrganismo deve ser isolado novamente do animal recém-doente e identificado como o mesmo microrganismo do patógeno original (Brock, 1961; Webster, 2007). Com isso, no presente trabalho só podemos afirmar que a temperatura elevada afetou a saúde de *A. viridis*.

Para *C. aff. nucula*, também foram observadas mudanças significativas na microbiota, mas as alterações como um todo se deram de forma diferente. A única alteração compartilhada entre a microbiota de *A. viridis* e de *C. aff. nucula* foi o aumento de Alphaproteobacteria (ANOVA: $p= 1 \times 10^{-7}$). *Chondrilla aff. nucula* também apresentou um aumento significativo do filo Acidobacteria (ANOVA: $p= 0,01$). Esse resultado é interessante, uma vez que normalmente em esponjas doentes é observada uma redução desse filo (Webster, 2008). Ainda não se sabe sobre fisiologia e metabolismo de Acidobacteria, mas por se tratar de um filo que foi considerado componente do microbioma central, seria interessante mais investigações. Adicionalmente, nenhum filo do microbioma central de *C. aff. nucula* teve redução significativa no tratamento com temperatura elevada em relação ao controle, com exceção do filo Firmicutes, mas a sua redução também se deu no controle, indicando que possivelmente o microbioma central de *C. aff. nucula* se manteve mais estável do que o microbioma de *A. viridis*. Além disso, a morfologia de *C. aff. nucula* também não sofreu grandes alterações como a de *A. viridis* (Figura 5-6). Observou-se apenas uma alteração no tecido, que se tornou um pouco mais fino, ficando os indivíduos mais espalhados no substrato. Vale destacar que essa resposta de *C. aff. nucula* foi observada até o final do experimento, que durou sete semanas, entretanto, não sabemos se a longo prazo haveria alterações mais profundas e mesmo morte. De qualquer maneira, ficou claro nesse trabalho que o holobionte *A. viridis* é mais suscetível ao aumento da temperatura do que *C. aff. nucula*.

É importante ressaltar que as diferenças observadas na resposta da comunidade microbiana de *A. viridis* e de *C. aff. nucula* podem estar refletindo diferentes flexibilidades dos microbiomas. O termo “flexibilidade do microbioma” foi proposto recentemente para corais (Ziegler *et al.*, 2019) e parece que esse padrão pode ocorrer também em esponjas. Ziegler e colaboradores (2019) não determinaram se diferenças na flexibilidade do microbioma estão associadas a mecanismos distintos de adaptação a mudanças ambientais do holobionte, mas sugeriram que microbiomas altamente flexíveis poderiam, teoricamente, suportar mudanças ambientais seguindo uma estratégia generalista. O problema é que com esse tipo de estratégia, corre-se o risco de perder importantes associações microbiológicas e/ou adquirir patógenos durante o processo. Por outro lado, um microbioma com baixa flexibilidade ajudaria a manter relações estáveis entre a esponja e seus microrganismos, conservando suas funções, o que seria uma estratégia mais especializada. De qualquer forma, o que observamos aqui foi que *A. viridis* respondeu de maneira mais “flexível”, porém com maior perda de simbioses do seu microbioma central e com aumento de diversas bactérias possivelmente oportunistas, o que culminou em 50% dos indivíduos branqueados e um

indivíduo morto. *Chondrilla* aff. *nucula*, por sua vez, teve algumas mudanças significativas em seu microbioma, com quatro OTUs representando a mudança que ocorreu durante a exposição a temperaturas altas, mas de maneira geral, manteve seu microbioma central sem grandes mudanças e sua morfologia não apresentou alterações intensas, não havendo morte de indivíduos.

Assim, comunidades bacterianas em esponjas parecem responder de maneira específica e, com isso, torna-se difícil a elucidação da resposta do microbioma de maneira universal frente ao aumento da temperatura do mar. No entanto, este trabalho demonstrou a importância de se analisar não apenas as mudanças isoladas na composição bacteriana, mas a flexibilidade do microbioma como um todo. Além disso, conseguimos demonstrar que o aumento da temperatura pode afetar de fato a microbiota das esponjas, causando doenças e até mesmo morte, o que condiz com estudos que associaram doenças em esponjas com alterações na microbiota e aumento de temperatura (Webster, 2007; Webster *et al.*, 2008; Sweet *et al.*, 2015, Ramsby *et al.*, 2018). Adicionalmente, o fato de o trabalho ter sido realizado *in situ*, reduz um grande número de variáveis, possibilitando elucidar de maneira mais realista a resposta do holobionte esponja ao aquecimento dos oceanos.

6. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que a exposição a temperaturas elevadas resultou na modificação da microbiota de *Amphimedon viridis* e de *Chondrilla aff. nucula* e em alterações morfológicas, principalmente em *A. viridis*, sugerindo uma maior sensibilidade desta espécie ao aumento da temperatura. Além disso, o princípio de Anna Karenina pode ser utilizado para explicar as mudanças individuais e aleatórias que ocorreram nos indivíduos sujeitos às perturbações ambientais. *Amphimedon viridis* apresentou diferenças significativas em 28 OTUs no tratamento com temperatura elevada e *C. aff. nucula* em quatro OTUs, sendo a mudança microbiana da primeira espécie sete vezes maior do que a da segunda, demonstrando que as esponjas podem apresentar flexibilidade em seu microbioma, sendo necessário verificar o comportamento da microbiota global das esponjas e não apenas mudanças isoladas. Com isso, comunidades bacterianas em esponjas parecem responder de maneira específica, dificultando a elucidação da resposta do microbioma de maneira universal frente ao aquecimento dos oceanos. O presente trabalho, realizado *in situ*, não esteve sujeito a um grande número de variáveis comuns em trabalhos feitos em aquários, possibilitando revelar de maneira mais realista a resposta do holobionte esponja ao aquecimento dos oceanos. Entretanto, mais estudos com diferentes abordagens, como, por exemplo, transcriptoma e mapeamento de metabólitos secundários são necessários para melhor compreensão desse distúrbio no metabolismo das esponjas e de seus simbiosites. Assim, poderemos avaliar com mais asserção o real efeito de um oceano em mudanças para as esponjas e, com isso, investir em metodologias e ferramentas que visem sua sobrevivência e conservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allemand-Martin, A. (1906)** Étude de physiologie appliquée sur la spongiculture sur le côtes de Tunisie. Dissertação, Tunísia.
- Allemand-Martin, A. (1914)** Contribution à l'étude de la culture des éponges. *C r Ass Advmt Sci Tunis*, 42, 375–377.
- Angermeier, H., Glöckner, V., Pawlik, J. R., Lindquist, N. L. & Hentschel, U. (2012)** Sponge white patch disease affecting the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *Diseases of aquatic organisms*, 99(2), 95-102.
- Arias-Ortiz, A., Serrano, O., Masqué, P., Lavery, P.S., Mueller, U., Kendrick, G.A., Rozaimi, M., Esteban, A., Fourqurean, J.W., Marbà, N., Mateo, M.A., Murray, K., Rule, M.J. & Duarte, C.M. (2018)** A marine heatwave drives massive losses from the world's largest seagrass carbon stocks. *Nat Clim Chang*, 8,1–7.
- Bergquist, P.R. (1978)** *Sponges*. Hutchinson: London & University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1-268 pp.
- Bewley, C.A., Holland, N.D. & Faulkner D.J (1996)** Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 52, 716–722.
- Bidder, G. (1896)** Note on projects for the improvement of sponge-fisheries. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 4(2), 195-202.
- Blanquer, A., Uriz, M. J., Cebrian, E. & Galand, P. E. (2016)** Snapshot of a bacterial microbiome shift during the early symptoms of a massive sponge die-off in the western Mediterranean. *Frontiers in microbiology*, 7, 752.
- Bourne, D.G., Morrow, K.M. & Webster, N.S. (2016)** Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 70, 317-340.
- Brice, J.J. (1896)** The fish and fisheries of the coastal waters of Florida. *U S Bur Fish, Rept Comm Fish*, 22, 263–342.
- Brock, T.D. (1961)** Milestones in microbiology. *Academic Medicine*, 36(7), 1-847 pp.
- Caporaso, J.G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N. & Knight, R. (2011)** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Cebrian, E., Uriz, M. J., Garrabou, J. & Ballesteros, E. (2011)** Sponge mass mortalities in a warming Mediterranean Sea: are cyanobacteria-harboring species worse off?. *PLoS One*, 6(6), e20211.
- Cerrano, C., Bavestrello, G., Bianchi, C.N., Cattaneovietti, R., Bava, S., Morganti, C., Morri, C., Picco, P., Sara, G., Shiaparelli, S., Siccardi, A. & Sponga, F. (2000)** A catastrophic

- massmortality episode of gorgonians and other organisms in the Ligurian Sea (North-Western Mediterranean), summer 1999. *Ecol Lett*, 3, 284–293.
- Cervino, J.M., Winiarski-Cervino, K., Polson, S.W., Goreau, T. & Smith, G.W. (2006)** Identification of bacteria associated with a disease affecting the marine sponge *Ianthella basta*. New Britain, Papua New Guinea. *Mar Ecol Prog Ser*, 324, 139–150.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R. & Tiedje, J. M. (2013)** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(D1), D633-D642.
- Coma, R., Ribes, M., Serrano, E., Jiménez, E., Salat, J. & Pascual, J. (2009)** Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6176-6181.
- Corriero, G., Scalera-Liaci, L. & Rizzello, R. (1996)** Osservazioni sulla mortalità di *Ircinia spinosula* (Schmidt) and *Ircinia* sp. (Porifera, Demospongiae) nell'insenatura della Strea di Porto Cesareo. *Thalassia Salent*, 22, 51–62.
- Cowart, J.D., Henkel, T.P., McMurray, S.E. & Pawlik, J.R. (2006)** Sponge orange band (SOB): a pathogenic-like condition of the giant barrel sponge *Xestospongia muta*. *Coral Reefs*, 25, 513.
- De Goeij, J. M., Van Oevelen, D., Vermeij, M. J., Osinga, R., Middelburg, J. J., De Goeij, A. F. & Admiraal, W. (2013)** Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. *Science*, 342(6154), 108-110.
- Deignan, L. K. & Pawlik, J. R. (2016)** Demographics of the Caribbean brown tube sponge *Agelas tubulata* on Conch Reef, Florida Keys, and a description of *Agelas* wasting syndrome (AWS). *Proc 13th ICRS, Honolulu*, 72-74.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, H., Dalevi, D., Hu, P. & Andersen, G. L. (2006)** Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 5069-5072.
- Duchassaing, F.P. & Michelotti, G. (1864)** Spongiaires de la mer Caraïbe. *Natuurkundige verhandelingen van de Hollandsche maatschappij der wetenschappen te Haarlem*, 21(2), 1-124.
- Erwin, P. M., Pita, L., López-Legentil, S. & Turon, X. (2012)** Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(20), 7358-7368.
- Fan, L., Liu, M., Simister, R., Webster, N. S. & Thomas, T. (2013)** Marine microbial symbiosis heats up: the phylogenetic and functional response of a sponge holobiont to thermal stress. *The ISME journal*, 7(5), 991.
- Fiore, C. L., Labrie, M., Jarett, J. K. & Lesser, M. P. (2015)** Transcriptional activity of the giant barrel sponge, *Xestospongia muta* Holobiont: molecular evidence for metabolic interchange. *Frontiers in microbiology*, 6, 364.

- Foster, K.R., Schluter, J., Coyte, K.Z. & Rakoff-Nahoum, S. (2017)** The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*, 548:43–51.
- Freeman, C. J. & Thacker, R. W. (2011)** Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnology and Oceanography*, 56(5), 1577-1586.
- Galstoff, P.S. (1942)** Wasting disease causing mortality of sponges in the West Indies and Gulf of Mexico. *Proc VIII American Science Congress*, 3, 411–421.
- Galstoff, P.S., Brown, H.H., Smith, C.L. & Walton Smith, F.G. (1939)** Sponge mortality in the Bahamas. *Nature*, 143, 807–808.
- Gammill, E.R. & Fenner, D. (2005)** *Disease threatens Caribbean sponges: report and identification guide*. Disponível em <<http://www.reefbase.org/spongedisease>> Acessado em 01/08/2019 .
- Gauthier, M. E. A., Watson, J. R. & Degnan, S. M. (2016)** Draft genomes shed light on the dual bacterial symbiosis that dominates the microbiome of the coral reef sponge *Amphimedon queenslandica*. *Frontiers in Marine Science*, 3, 196.
- Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P. & Borchiellini, C. (2012)** No longer Demospongiae: Homoscleromorph sponges revisited by molecular phylogeny, Linnaean classification and the PhyloCode. *Hydrobiologia*, 687(1), 3-10.
- Gochfeld, D. J., Schlöder, C. & Thacker, R. W. (2007)** Sponge community structure and disease prevalence on coral reefs in Bocas del Toro, Panama. *Porifera Research: Biodiveristy, Innovation and Sustainability*, 335-343.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001)** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 9pp.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J. & Moore, B. S. (2002)** Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9), 4431-4440.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M. & Taylor, M. W. (2012)** Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641pp.
- Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C. & Hacker, J. (2001)** Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 305-312.
- Hentschel, U., Usher, K. M. & Taylor, M. W. (2006)** Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS microbiology ecology*, 55(2), 167-177.
- Hester, E. R., Barott, K. L., Nulton, J., Vermeij, M. J. & Rohwer, F. L. (2016)** Stable and sporadic symbiotic communities of coral and algal holobionts. *The ISME journal*, 10(5), 1157.
- Hill, M., Hill, A., Lopez, N. & Harriott, O. (2006)** Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Marine Biology*, 148(6), 1221-1230.

- Hooper J.N., Van Soest R.W. & Debrenne F. (2002)** *Phylum Porifera* Grant, 1836. In *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Springer US, 9-13.
- IPCC (2013)** Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, UK/New York, 1535 pp.
- Klautau, M., Russo, C. A., Lazoski, C., Boury-Esnault, N., Thorpe, J. P. & Solé-Cava, A. M. (1999)** Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution*, 53(5), 1414-1422.
- Laubier, L., Perez, T., Lejeune, C., Garrabou, J., Chevaldonne, P., Vacelet, J., Boury-Esnault, N. & Harmelin, J.G. (2003)** La Méditerranée se réchauffe-t-elle? Is the Mediterranean warming up? *Mar Life*, 1-2, 71-81.
- Lemoine, N., Buell, N., Hill, A. & Hill, M. (2007)** Assessing the utility of sponge microbial symbiont communities as models to study global climate change: a case study with *Halichondria bowerbanki*. In *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E., and Muricy, G. (eds). Rio de Janeiro, Brazil: Série Livros, Museu Nacional, 419-425.
- Letunic, I. & Bork, P. (2019)** Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 47(1), W256-W259.
- Li, C.W., Chen, J.Y. & Hua, T.E. (1998)** Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, 279(5352), 879-882.
- López-Legentil, S., Erwin, P.E., Pawlik, J.R. & Song, B. (2010)** Effects of sponge bleaching on ammonia-oxidizing *Archaea*: distribution and relative expression of ammonia monooxygenase genes associated with the giant barrel sponge *Xestospongia muta*. *Mol Ecol*, 60, 561-571.
- López-Legentil, S., Song, B., McMurray, S.E. & Pawlik, J.R. (2008)** Bleaching and stress in coral reef ecosystems: *hsp70* expression by the giant barrel sponge *Xestospongia muta*. *Mol Ecol*, 17, 1840-1849.
- Luter, H. M., Whalan, S. & Webster, N. S. (2010)** Exploring the role of microorganisms in the disease-like syndrome affecting the sponge *Ianthella basta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(17), 5736-5744.
- Maldonado, M., Aguilar, R., Bannister, R. J., Bell, J. J., Conway, K. W., Dayton, P. K., Díaz, C., Gutt, J., Kelly, M., Kenchington, E.L.R., Leys, S.P., Pomponi, S.A., Rapp, H.T., Rützler, K., Tendal, O.S., Vacelet, J. & Young, C.M. (2017)** Sponge grounds as key marine habitats: a synthetic review of types, structure, functional roles, and conservation concerns. *Marine animal forests: The ecology of benthic biodiversity hotspots*, 145-183.
- Maldonado, M., Sánchez-Tocino, L. & Navarro, C. (2010)** Recurrent disease outbreaks in corneous demosponges of the genus *Ircinia*: epidemic incidence and defense mechanisms. *Marine Biology*, 157(7), 1577-1590.

- McMurray, S. E., Henkel, T. P. & Pawlik, J. R. (2010)** Demographics of increasing populations of the giant barrel sponge *Xestospongia muta* in the Florida Keys. *Ecology*, 91(2), 560-570.
- Munro, M.H.G., Leibrand R.T. & Blunt J.W. (1987)** The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. In: *Bioorganic Marine Chemistry 1* (Scheuer P.J.,Ed.), 93–176. Springer Verlag, Heidelberg.
- Nagelkerken, I., Aerts, L. & Pors, L. (2000)** Barrel sponge bows out. In *Reef Encounter*. Kansas, USA: International Society for Reef Studies, 14–15.
- Oliver, E.C.J., Donat, M.G., Burrows, M.T., Moore, P.J., Smale, D.A., Alexander, L.V., Benthuyzen, J.A., Feng, M., Sen, G.A., Hobday, A.J., Holbrook, N.J., PerkinsKirkpatrick, S.E., Scannell, H.A., Straub, S.C. & Wernberg, T. (2018)** Longer and more frequent marine heatwaves over the past century. *Nat Commun*, 9, 1–12.
- Olson, J.B., Gochfeld, D.J. & Slattery, M. (2006)** *Aplysina* red band syndrome: a new threat to Caribbean sponges. *Dis Aquat Organ*, 71, 163–168.
- Paz, M. (1997)** New killer disease attacks giant barrel sponge. *San Pedro Sun*, Belize: 7 March. Disponível em <<http://sanpedrosun.net/old/sponge.html>>. Acessado em 01/08/2019.
- Perez, T., Diaz, M. C., Ruiz, C., Condor-Lujan, B., Klautau, M., Hajdu, E., Lobo-Hajdu, G., Zea, S., Pomponi, S.A., Thacker, R.W., Carteron, S, Tollu, G., Pouget-Cuvelier, A., Thélamon, P., Marechal, J., Thomas, O.P., Ereskovsky, A.V., Vacelet, J. & Boury-Esnault, N. (2017)**. How a collaborative integrated taxonomic effort has trained new spongiologists and improved knowledge of Martinique Island (French Antilles, eastern Caribbean Sea) marine biodiversity. *PloS one*, 12(3), e0173859.
- Perez, T., Garrabou, J., Sartoretto, S., Harmelina, J.-G., Francour, P. & Vacelet, J. (2000)** Mortalité massive d’invertébrés marins: un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale. *Life Sci*, 323, 853–865.
- Pita L., Rix L., Slaby B.M., Franke A. & Hentschel U. (2018)** The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome*, 6, 46.
- Potens, R. M. (2016)** Characterization of the Marine Sponge *Amphimedon compressa* Microbiome Across a Spatial Gradient. Dissertação. Nova Southeastern University, Flórida. 147pp.
- Pronzato, R., & Manconi, R. (2008)** Mediterranean commercial sponges: over 5000 years of natural history and cultural heritage. *Marine Ecology*, 29(2), 146-166.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2012)** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Ramsby, B. D., Hoogenboom, M. O., Whalan, S. & Webster, N. S. (2018)** Elevated seawater temperature disrupts the microbiome of an ecologically important bioeroding sponge. *Molecular ecology*, 27(8), 2124-2137.

- Rapp, H. T., Janussen, D. & Tendal, O. S. (2011)** Calcareous sponges from abyssal and bathyal depths in the Weddell Sea, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1-2), 58-67.
- Sampaio, E. & Rosa, R. (2019)** Climate Change, Multiple Stressors, and Responses of Marine Biota. *Springer Nature Switzerland* W. Leal Filho et al. (eds.), *Climate Action*, 13 pp.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H, Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B, Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. (2009)** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23), 7537-7541.
- Schmidt, O. (1862)** Die Spongien des adriatischen Meeres. (Wilhelm Engelmann: Leipzig): i-viii, 1-88.
- Schmitz F.J. (1994)** Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. *In: Sponges in Time and Space Biology, Chemistry, Paleontology* (Proceedings of the 4th International Porifera Congress, Amsterdam, Netherlands) (van Soest R.W.M. van Kempen Th.M.G Braekman J.C. , Eds.), Balkema.
- Skoufas, G. (2003)** Massive necrosis of sedentary benthic animal organisms in the North Aegean Sea. *In 7th Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries*. Chersonissos, Greece: National Centre for Marine Research.
- Slaby, B. M., Franke, A., Rix, L., Pita, L., Bayer, K., Jahn, M. T. & Hentschel, U. (2019)** Marine Sponge Holobionts in Health and Disease. *In Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*. Springer, Dordrecht. 81-104.
- Smith, F.G.W. (1941)** Sponge disease in British Honduras, and its transmission by water currents. *Ecology* 22: 415–421.
- Sokolow, S. (2009)** Effects of a changing climate on the dynamics of coral infectious disease: a review of the evidence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(1-2), 5-18.
- Sunagawa, S., Woodley, C. M. & Medina, M. (2010).** Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PloS one*, 5(3), e9554.
- Sweet, M., Bulling, M. & Cerrano, C. (2015)** A novel sponge disease caused by a consortium of micro-organisms. *Coral Reefs*, 34(3), 871-883.
- Thiel, V., Leininger, S., Schmaljohann, R., Brümmer, F. & Imhoff, J. F. (2007)** Sponge-specific bacterial associations of the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Tetractinomorpha). *Microbial Ecology*, 54(1), 101-111.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C. & Webster, N.S. (2016)** Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature communications*, 7, 11870.

- Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M. Z., Yung, P. Y., Lewis, M., Halpern, A. & Kjelleberg, S. (2010).** Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *The ISME journal*, 4(12), 1557.
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K.J., Prill, R.J., Tripathi, A., Sean M. Gibbons, S.M., Ackermann, G., Navas-Molina, J.A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., James T. Morton, J.T., Mirarab, S., Xu, Z.Z., Jiang, L., Haroon, M.F., Kanbar, J., Zhu, Q., Song, S.J., Kosciulek, S., Bokulich, N.A., Lefler, J., Brislawn, C.J., Humphrey, G., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J.A., Clauset, A., Stevens, R.L., Shade, A., Pollard, K.S., Goodwin, K.D., Jansson, J. K., Gilbert, J. A., Knight, R., & The Earth Microbiome Project Consortium. (2017)** A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551, 457-463.
- Unson, M.D. & Faulkner, D.J. (1993)** Cyanobacterial symbiont synthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, 44, 1021–1022.
- Unson, M.D., Holland, N.D. & Faulkner, D.J. (1994)** A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.*, 119, 1–11.
- Vacelet, J. (1994)** Control of the severe sponge epidemic. Near East and Europe: Algeria, Cyprus, Egypt, Lebanon, Malta, Morocco, Syria, Tunisia, Turkey, Yugoslavia. In: *Technical Report: The Struggle against the Epidemic Which Is Decimating Mediterranean Sponges, FI: TCP/RAB/8853*. Rome, Italy: FAO, 1–39.
- Vacelet, J., Vacelet, E., Gaino, E. & Gallissian, M.-F. (1994)** Bacterial attack of spongin skeleton during the 1986–1990 Mediterranean sponge disease. In *Sponges in Time and Space*. van Soest, R.W.M., van Kempen, T.M.G., and Braekman, J.C. (eds). Rotterdam, the Netherlands: A.A. Balkema, 355–362.
- Van Soest, R.W.M., Boury-Esnault, N., Hooper, J.N.A., Rützler, K., de Voogd, N.J., Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A.B., Manconi, R., Schönberg, C., Klautau, M., Picton, B., Kelly, M., Vacelet, J., Dohrmann, M., Díaz, M.-C., Cárdenas, P., Carballo, J.L., Ríos, P. & Downey, R. (2019).** World Porifera database. Disponível < <http://www.marinespecies.org/porifera> > Acessado em 01/08/2019.
- Van Soest, R.W.M, Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. & Hooper, J. N. (2012)** Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*, 7(4), e35105.
- Vicente, V.P. (1989)** Regional commercial sponge extinction in the West Indies: are recent climatic changes responsible? *Mar Ecol Prog Ser*, 10, 179–191.
- Walton Smith, F.G. (1939)** Sponge mortality at British Honduras. *Nature* 143, 785.

- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007)** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Warn, F. (2000)** *Bitter Sea: The Real Story of Greek Sponge Diving*. Ferrers, UK: Guardian Angel.
- Webster, N. S. (2007)** Sponge disease: a global threat? *Environmental Microbiology*, 9(6), 1363-1375.
- Webster, N.S., Negri, A.P., Webb, R.I. & Hill, R.T. (2002)** A spongin-boring alpha proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. *Mar Ecol Prog Ser*, 232, 305–309.
- Webster, N. S. & Taylor, M. W. (2012)** Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental microbiology*, 14(2), 335-346.
- Webster, N. S., Xavier, J. R., Freckelton, M., Motti, C. A. & Cobb, R. (2008)** Shifts in microbial and chemical patterns within the marine sponge *Aplysina aerophoba* during a disease outbreak. *Environmental Microbiology*, 10(12), 3366-3376.
- Wulff, J.L. (2006)** Rapid diversity and abundance decline in a Caribbean coral reef sponge community. *Biol Conserv*, 127, 167–176.
- Yang, Q., Zhang, W. & Franco, C. M. (2019)** Response of Sponge Microbiomes to Environmental Variations. In *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*. Springer, Dordrecht, 181-247.
- Zaneveld, J. R., McMinds, R. & Thurber, R. V. (2017)** Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nature microbiology*, 2(9), 17121.
- Ziegler, M., Grupstra, C. G., Barreto, M. M., Eaton, M., BaOmar, J., Zubier, K., Al-Sofyani, A., Turki, A.J., Ormond, R. & Voolstra, C. R. (2019)** Coral bacterial community structure responds to environmental change in a host-specific manner. *Nature communications*, 10(1), 3092.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Abundância de filios bacterianos do microbioma central e variável de *Amphimedon viridis*. AV= *Amphimedon viridis*; n=16. *=classe pertencentes ao filo Proteobacteria.

Filo	AV1	AV2	AV3	AV4	AV5	AV6	AV7	AV8	AV9	AV10	AV11	AV12	AV13	AV14	AV15	AV16
Acidobacteria	0,47%	0,001%	0,01%	0,001%	-	0,01%	0,005%	-	0,04%	0,002%	0,003%	-	0,004%	0,02%	0,01%	0,01%
Actinobacteria	1,65%	1,63%	2,58%	1,31%	1,63%	3,35%	5,41%	1,82%	0,74%	2,83%	3,07%	1,49%	1,34%	4,42%	1,07%	1,42%
Bacteroidetes	0,19%	0,44%	0,75%	0,22%	0,11%	0,33%	4,35%	0,45%	0,15%	0,60%	0,39%	0,09%	0,27%	0,21%	0,12%	0,31%
Chloroflexi	2,53%	0,05%	0,09%	0,02%	0,01%	0,34%	0,04%	0,03%	0,19%	0,01%	0,02%	0,03%	0,04%	0,05%	0,09%	0,01%
Cyanobacteria	7,40%	13,02%	15,51%	9,46%	10,60%	21,36%	21,39%	13,06%	5,38%	21,91%	20,34%	6,56%	10,12%	21,19%	8,08%	14,99%
Dadabacteria	0,002%	0,07%	0,04%	0,04%	0,05%	0,06%	0,02%	-	-	0,01%	0,01%	-	0,57%	0,38%	0,02%	0,07%
Deinococcus-Thermus	-	0,01%	-	-	-	-	-	-	0,04%	-	-	-	0,001%	-	-	0,001%
Epsilonbacteraeota	0,01%	0,002%	0,01%	0,001%	0,02%	0,004%	0,001%	-	-	-	0,004%	0,001%	0,01%	-	-	-
Firmicutes	34,07%	17,51%	14,28%	10,04%	13,67%	6,38%	22,12%	31,49%	39,95%	6,33%	9,06%	12,93%	10,49%	6,79%	17,12%	10,25%
Gemmatimonadetes	2,81%	0,004%	0,004%	0,003%	-	0,29%	0,004%	0,002%	0,09%	-	0,003%	0,01%	0,001%	-	0,002%	0,01%
Marinimicrobia (SAR406 clade)	-	0,02%	0,01%	0,003%	0,01%	0,02%	0,19%	0,02%	-	0,04%	0,02%	0,02%	0,01%	0,01%	-	0,01%
Planctomycetes	0,15%	0,23%	0,68%	0,18%	0,15%	0,32%	0,50%	0,12%	0,12%	0,19%	0,29%	0,10%	0,34%	0,91%	0,32%	0,20%
Proteobacteria	50,70%	66,92%	65,83%	78,70%	73,68%	67,50%	45,82%	52,99%	53,30%	68,05%	66,69%	78,79%	76,73%	65,89%	73,17%	72,71%
Alphaproteobacteria*	0,64%	1,12%	2,60%	0,78%	0,90%	1,81%	4,61%	0,74%	0,28%	1,83%	1,70%	0,32%	1,57%	2,82%	0,48%	1,26%
Deltaproteobacteria*	0,18%	0,04%	0,38%	0,02%	0,02%	0,07%	0,11%	0,04%	0,20%	0,03%	0,03%	0,02%	0,02%	0,04%	0,02%	0,03%
Gammaproteobacteria*	49,88%	65,76%	62,85%	77,90%	72,76%	65,61%	41,10%	52,20%	52,82%	66,20%	64,96%	78,45%	75,13%	63,03%	72,67%	71,43%
Verrucomicrobia	0,01%	0,08%	0,24%	0,04%	0,06%	0,04%	0,16%	0,03%	-	0,02%	0,09%	-	0,07%	0,13%	-	0,001%

Tabela S2. Abundância de filos bacterianos do microbioma central e variável de *Chondrilla* aff. *nucula*. CN= *Chondrilla* aff. *nucula*; n=10.
*=classe pertencentes ao filo Proteobacteria.

Filo	CN1	CN2	CN3	CN4	CN5	CN6	CN7	CN8	CN9	CN10
Acidobacteria	1,09%	5,33%	1,05%	4,47%	1,29%	0,18%	3,03%	0,16%	1,64%	1,28%
Actinobacteria	2,62%	19,91%	2,12%	4,88%	1,65%	1,74%	7,01%	10,73%	6,83%	1,65%
Bacteroidetes	0,19%	0,32%	0,07%	0,33%	0,07%	0,03%	0,21%	0,08%	0,05%	0,13%
Chloroflexi	11,11%	39,04%	8,80%	19,42%	5,93%	3,73%	28,16%	4,70%	7,14%	4,55%
Cyanobacteria	1,88%	1,70%	1,45%	5,63%	0,34%	0,18%	13,27%	0,46%	0,11%	0,63%
Dadabacteria	0,04%	0,34%	0,04%	0,15%	0,04%	0,02%	0,09%	0,01%	0,01%	0,03%
Firmicutes	69,52%	14,71%	76,07%	40,75%	82,55%	89,44%	31,05%	74,70%	78,89%	76,48%
Gemmatimonadetes	1,19%	8,51%	0,33%	8,81%	0,89%	0,24%	5,61%	0,30%	0,19%	0,85%
Nitrospinae	0,03%	0,12%	0,01%	0,45%	0,06%	0,002%	0,16%	0,06%	0,01%	0,02%
Nitrospirae	0,08%	0,06%	0,01%	0,14%	0,02%	0,01%	0,05%	0,003%	0,01%	0,02%
Patescibacteria	0,15%	0,87%	0,05%	1,06%	0,11%	0,03%	0,77%	0,01%	0,18%	0,11%
PAUC34f	0,02%	0,13%	0,02%	0,02%	0,02%	0,003%	0,03%	0,02%	0,02%	0,02%
Poribacteria	0,03%	0,02%	0,08%	0,08%	0,02%	0,003%	0,01%	0,01%	0,01%	0,17%
Proteobacteria	12,05%	8,92%	9,89%	13,82%	7,02%	4,40%	10,55%	8,57%	4,90%	14,04%
Alphaproteobacteria*	0,90%	2,94%	0,32%	5,87%	0,30%	0,20%	5,62%	0,52%	0,17%	0,43%
Deltaproteobacteria*	0,39%	0,90%	0,12%	0,60%	0,75%	0,04%	1,04%	0,22%	0,06%	0,11%
Gammaproteobacteria*	10,76%	5,08%	9,45%	7,35%	5,97%	4,15%	3,88%	7,83%	4,67%	13,50%
Verrucomicrobia	-	0,01%	0,01%	-	-	-	0,01%	0,20%	0,002%	0,01%

Tabela S3. Abundância relativa de filos bacterianos dos indivíduos de *Amphimedon viridis* no controle ao longo do experimento. AV= *Amphimedon viridis*; n=8.*=classe pertencentes ao filo Proteobacteria.

<i>Amphimedon viridis</i> CONTROLE	T0	T1	T0	T1	T2	T0	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T2	T0	T1	T0	T1	T2
Filo	AV1		AV2			AV3	AV4		AV5		AV6			AV7		AV8		
Acidobacteria	0,47%	0,05%	0,001%	-	-	0,01%	0,001%	0,01%	-	0,01%	0,01%	0,02%	-	0,005%	0,01%	-	0,01%	-
Actinobacteria	1,65%	9,42%	1,63%	7,18%	2,82%	2,58%	1,31%	2,24%	1,63%	5,44%	3,35%	4,72%	3,19%	5,41%	10,58%	1,82%	8,32%	4,83%
Bacteroidetes	0,19%	0,52%	0,44%	1,09%	0,29%	0,75%	0,22%	0,12%	0,11%	0,31%	0,33%	0,67%	0,46%	4,35%	0,62%	0,45%	0,28%	0,14%
Chlamydiae	-	0,21%	-	0,18%	0,23%	-	-	0,05%	-	0,04%	-	0,08%	0,20%	-	0,07%	-	0,02%	0,12%
Chloroflexi	2,53%	0,04%	0,05%	0,02%	0,04%	0,09%	0,02%	0,07%	0,01%	0,03%	0,34%	0,09%	0,11%	0,04%	0,11%	0,03%	0,09%	0,06%
Cyanobacteria	7,40%	38,59%	13,02%	36,19%	30,17%	15,51%	9,46%	8,90%	10,60%	33,57%	21,36%	41,97%	28,61%	21,39%	41,59%	13,06%	43,45%	34,08%
Dadabacteria	0,00%	-	0,07%	-	0,01%	0,04%	0,04%	-	0,05%	-	0,06%	-	0,29%	0,02%	-	-	-	0,09%
Deinococcus-Thermus	-	-	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epsilonbacteraeota	0,01%	-	0,002%	-	-	0,01%	0,001%	-	0,02%	-	0,004%	-	-	0,001%	-	-	-	-
Firmicutes	34,07%	0,54%	17,51%	1,92%	0,27%	14,28%	10,04%	11,39%	13,67%	5,40%	6,38%	0,80%	0,09%	22,12%	0,81%	31,49%	3,19%	0,12%
Gemmatimonadetes	2,81%	-	0,004%	-	-	0,004%	0,003%	-	-	-	0,29%	-	-	0,004%	-	0,002%	-	-
Marinimicrobia (SAR406 clade)	-	0,03%	0,02%	0,08%	0,04%	0,01%	0,003%	0,001%	0,01%	0,01%	0,02%	0,04%	0,03%	0,19%	0,05%	0,02%	-	0,01%
Planctomycetes	0,15%	0,68%	0,23%	0,38%	1,65%	0,68%	0,18%	0,22%	0,15%	0,41%	0,32%	0,43%	1,37%	0,50%	0,60%	0,12%	0,48%	3,22%
Proteobacteria	50,70%	49,84%	66,92%	52,88%	64,43%	65,83%	78,70%	76,93%	73,68%	54,59%	67,50%	51,04%	65,54%	45,82%	45,42%	52,99%	44,10%	57,27%
Alphaproteobacteria*	0,64%	3,10%	1,12%	3,68%	1,74%	2,60%	0,78%	0,72%	0,90%	1,57%	1,81%	4,17%	3,13%	4,61%	2,53%	0,74%	6,22%	1,49%
Deltaproteobacteria*	0,18%	0,08%	0,04%	0,15%	0,05%	0,38%	0,02%	0,07%	0,02%	0,21%	0,07%	0,14%	0,11%	0,11%	0,06%	0,04%	0,12%	0,04%
Gammaproteobacteria*	49,88%	46,66%	65,76%	49,06%	62,63%	62,85%	77,90%	76,14%	72,76%	52,81%	65,61%	46,73%	62,30%	41,10%	42,84%	52,20%	37,77%	55,74%
Verrucomicrobia	0,01%	0,07%	0,08%	0,07%	0,06%	0,24%	0,04%	0,07%	0,06%	0,06%	0,04%	0,14%	0,10%	0,16%	0,13%	0,03%	0,05%	0,06%

Tabela S4. Abundância relativa de filós bacterianos dos indivíduos de *Amphimedon viridis* no tratamento com temperatura elevada ao longo do experimento. AV= *Amphimedon viridis*; n=8.*=classe pertencentes ao filo Proteobacteria.

<i>Amphimedon viridis</i> TRATAMENTO	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2		
Filo	AV9			AV10			AV11			AV12		AV13			AV14			AV15			AV16		
Acidobacteria	0,04%	0,2%	0,03%	0,002%	0,2%	0,1%	0,003%	0,02%	0,04%	-	0,3%	0,004%	0,3%	0,1%	0,02%	0,1%	0,04%	0,01%	0,2%	0,1%	0,01%	0,1%	0,1%
Actinobacteria	0,7%	2,7%	5,4%	2,8%	2,0%	3,1%	3,1%	3,3%	4,6%	1,5%	4,2%	1,3%	4,4%	8,5%	4,4%	6,3%	7,8%	1,1%	1,8%	7,5%	1,4%	3,1%	4,9%
Bacteroidetes	0,2%	0,8%	0,5%	0,6%	0,8%	11,4%	0,4%	2,7%	0,8%	0,1%	2,3%	0,3%	1,2%	9,2%	0,2%	0,8%	14,5%	0,1%	0,6%	15,1%	0,3%	1,5%	0,5%
Chlamydiae	-	0,9%	0,4%	-	0,5%	0,4%	-	0,4%	0,8%	-	1,3%	-	0,5%	1,7%	-	1,9%	1,4%	-	0,5%	1,0%	-	0,8%	0,8%
Chloroflexi	0,2%	0,6%	0,1%	0,01%	0,3%	0,1%	0,02%	0,1%	0,2%	0,03%	1,4%	0,04%	0,8%	0,2%	0,05%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	0,1%	0,01%	0,4%	0,3%
Cyanobacteria	5,4%	32,1%	34,7%	21,9%	17,1%	22,6%	20,3%	31,8%	34,7%	6,6%	32,5%	10,1%	23,6%	34,4%	21,2%	34,8%	35,8%	8,1%	18,5%	34,9%	15,0%	27,7%	31,0%
Dadabacteria	-	0,02%	0,2%	0,01%	0,1%	0,1%	0,01%	0,05%	0,1%	-	0,1%	0,6%	0,7%	0,1%	0,4%	0,8%	0,04%	0,0%	-	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Deinococcus-Thermus	0,04%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001%	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001%	-	-
Epsilonbacteraeota	-	-	-	-	-	-	0,004%	-	-	0,001%	-	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Firmicutes	40,0%	3,1%	0,3%	6,3%	2,2%	0,3%	9,1%	0,6%	0,3%	12,9%	1,8%	10,5%	1,0%	1,4%	6,8%	1,5%	2,1%	17,1%	1,7%	0,8%	10,3%	4,5%	0,3%
Gemmatimonadetes	0,1%	0,3%	-	-	0,1%	-	0,003%	0,01%	-	0,01%	0,1%	0,001%	0,005%	-	-	0,01%	-	0,002%	0,001%	-	0,01%	0,01%	-
Marinimicrobia (SAR406 clade)	-	-	-	0,04%	-	-	0,02%	-	-	0,02%	-	0,01%	-	-	0,01%	-	-	-	-	-	0,01%	-	-
Planctomycetes	0,1%	1,3%	1,8%	0,2%	1,2%	1,1%	0,3%	1,2%	1,9%	0,1%	5,3%	0,3%	3,6%	2,3%	0,9%	2,4%	1,5%	0,3%	1,7%	1,6%	0,2%	2,0%	2,6%
Proteobacteria	53,3%	57,9%	56,5%	68,1%	75,4%	60,6%	66,7%	59,5%	56,4%	78,8%	49,2%	76,7%	62,8%	41,8%	65,9%	51,2%	36,5%	73,2%	74,4%	38,7%	72,7%	59,5%	59,2%
Alphaproteobacteria*	0,3%	4,2%	2,9%	1,8%	4,5%	20,9%	1,7%	5,7%	3,2%	0,3%	9,3%	1,6%	11,6%	38,4%	2,8%	13,8%	26,4%	0,5%	4,5%	34,5%	1,3%	5,6%	4,2%
Deltaproteobacteria*	0,2%	0,2%	0,1%	0,03%	0,1%	2,0%	0,03%	0,1%	0,1%	0,02%	1,1%	0,02%	0,1%	0,4%	0,04%	0,1%	0,3%	0,02%	0,2%	0,2%	0,03%	0,1%	0,1%
Gammaproteobacteria*	52,8%	53,5%	53,5%	66,2%	70,9%	37,7%	65,0%	53,7%	53,2%	78,4%	38,8%	75,1%	51,1%	3,0%	63,0%	37,3%	9,8%	72,7%	69,7%	4,0%	71,4%	53,7%	54,8%
Verrucomicrobia	-	0,1%	0,1%	0,02%	0,2%	0,3%	0,1%	0,2%	0,1%	-	1,5%	0,1%	1,0%	0,3%	0,1%	0,1%	0,3%	-	0,3%	0,3%	0,001%	0,4%	0,2%

Tabela S6. Abundância relativa de filos bacterianos dos indivíduos de *Chondrilla* aff. *nucula* no tratamento com temperatura elevada ao longo do experimento. CN= *Chondrilla* aff. *nucula*; n=5. *=classe pertencentes ao filo Proteobacteria.

<i>Chondrilla</i> aff. <i>nucula</i> TRATAMENTO	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T0	T1
Filo	CN6			CN7			CN8			CN9		CN10	
Acidobacteria	0,18%	3,19%	8,91%	3,03%	7,15%	2,98%	0,16%	3,27%	2,08%	1,64%	12,13%	1,28%	5,15%
Actinobacteria	1,74%	30,44%	3,78%	7,01%	9,22%	9,20%	10,73%	21,96%	5,85%	6,83%	23,47%	1,65%	23,75%
Bacteroidetes	0,03%	0,32%	2,07%	0,21%	2,37%	0,71%	0,08%	0,26%	0,55%	0,05%	0,72%	0,13%	0,66%
Chloroflexi	3,73%	50,90%	25,21%	28,16%	42,60%	13,54%	4,70%	62,08%	22,29%	7,14%	42,97%	4,55%	37,68%
Cyanobacteria	0,18%	1,57%	11,69%	13,27%	4,00%	14,50%	0,46%	1,34%	7,53%	0,11%	1,96%	0,63%	15,52%
Dadabacteria	0,02%	-	-	0,09%	-	-	0,01%	-	-	0,01%	-	0,03%	-
Firmicutes	89,44%	1,56%	0,77%	31,05%	0,08%	3,65%	74,70%	5,83%	25,38%	78,89%	5,93%	76,48%	3,06%
Gemmatimonadetes	0,24%	9,54%	7,23%	5,61%	16,18%	8,74%	0,30%	2,05%	5,80%	0,19%	4,19%	0,85%	9,25%
Nitrospinae	0,002%	0,001%	0,001%	0,16%	0,001%	0,001%	0,06%	0,001%	-	0,01%	0,001%	0,02%	0,01%
Nitrospirae	0,01%	0,00%	0,01%	0,05%	0,30%	0,003%	0,003%	0,08%	0,01%	0,01%	0,19%	0,02%	0,14%
Patescibacteria	0,03%	0,51%	0,02%	0,77%	0,46%	0,01%	0,01%	0,41%	0,09%	0,18%	0,81%	0,11%	0,61%
PAUC34f	0,003%	0,001%	0,001%	0,03%	0,001%	0,001%	0,02%	0,001%	0,001%	0,02%	0,001%	0,02%	-
Poribacteria	0,003%	0,001%	0,001%	0,01%	0,001%	0,001%	0,01%	0,001%	0,001%	0,01%	0,001%	0,17%	-
Proteobacteria	4,40%	1,94%	39,51%	10,55%	17,63%	46,49%	8,57%	2,57%	29,49%	4,90%	7,49%	14,04%	4,11%
Alphaproteobacteria*	0,20%	0,92%	36,21%	5,62%	10,12%	41,95%	0,52%	0,84%	17,72%	0,17%	1,48%	0,43%	1,68%
Deltaproteobacteria*	0,04%	0,16%	0,18%	1,04%	4,53%	0,50%	0,22%	0,31%	0,43%	0,06%	0,56%	0,11%	0,43%
Gammaproteobacteria*	4,15%	0,87%	3,13%	3,88%	2,98%	4,04%	7,83%	1,41%	11,34%	4,67%	5,44%	13,50%	2,01%
Verrucomicrobia	-	0,00%	0,17%	0,01%	0,003%	0,04%	0,20%	0,07%	0,26%	0,002%	0,04%	0,01%	0,04%