



**FUNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(PPGBBE)

**CECILIA DO VALLE PINTO PEREIRA**

**Diversidade de *Vibrio shiloi* associado ao poliqueta *Hermodice carunculata* e ao coral  
*Madracis decactis* no Arquipélago de São Pedro e São Paulo.**

RIO DE JANEIRO

Julho, 2013



instituto de  
**biologia**



**CECILIA DO VALLE PINTO PEREIRA**

**Diversidade de *Vibrio shiloi* associado ao poliqueta *Hermodice carunculata* e ao coral *Madracis decactis* no Arquipélago de São Pedro e São Paulo.**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano L. Thompson

RIO DE JANEIRO

Julho, 2013

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**PEREIRA, Cecilia do Valle Pinto**

**Diversidade de *Vibrio shiloi* associado ao poliqueta *Hermodice carunculata* e ao coral *Madracis decactis* no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. 2013. 112 pp.**

**Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Rio de Janeiro, 2013.**

**Orientador: Fabiano L. Thompson**

**1 – *Vibrio shiloi*      2- *Vibrio mediterranei*      3 – Biodiversidade**

**4 – *Madracis decactis*    5 – *Hermodice carunculata***

**I – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Pós Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por ter me guiado e colocado anjos durante todo o meu caminho.

A meus pais e minha família, por serem minha base, onde eu aprendi meus valores e princípios. Minha fortaleza e por saber que sempre vou encontrar um carinho acolhedor perto de vocês.

A meu orientador Fabiano L. Thompson por ter me proporcionado oportunidades únicas, enriquecedoras e desafiadoras, que moldaram meu desenvolvimento enquanto Cientista, Bióloga e Pessoa.

Aos meus amigos de laboratório, ou melhor, uma das minhas famílias, por me apoiarem, incentivarem e estarem sempre ao meu lado, me auxiliando em cada etapa do desenvolvimento dessa dissertação. Muitos de vocês são muito mais que somente colegas de trabalho, mas amigos que deixaram uma parte de vocês comigo. Vou carregar vocês para sempre seja com a experiência passada profissionalmente ou pessoalmente. Agradeço Papai do Céu por ter conhecido e convivido com cada um de vocês.

Aos meus amigos de graduação por estarem sempre por perto compartilhando as experiências vividas, cada um em seu campo de trabalho. Por me proporcionarem momentos tão prazerosos a tanto tempo. Aos meus amigos não biólogos que por mais que não entendessem o que eu faço sempre estavam dispostos a ouvir minhas experiências. Ao meu namorado, Jorge, por me mostrar um mundo novo, um mundo de não biólogos, e por mais que não entendesse muito do meu mundo sempre me ouviu pacientemente.

Ao Bruno, Ana Paula, Nelson e Cristiane pelo apoio, pelos ensinamentos e pela atuação crucial no desenvolvimento dessa dissertação. Obrigada queridos por estarem sempre ao meu lado me ensinando e realizando experimentos e análises. Saibam que cresci muito profissionalmente e pessoalmente trabalhando diretamente com vocês. Obrigada por cada experiência trocada.

Aos membros da banca, agradeço pela presença e por aceitaram compartilhar comigo esse momento único na minha carreira.

As agências financiadoras CAPES e CNPQ, pelo apoio para a realização desse trabalho.

*“Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária,  
para aceitar as coisas que não podemos modificar,  
Coragem para modificar aquelas que podemos e  
Sabedoria para distinguirmos umas das outras.”*  
*Reihold Niebuhr*

## RESUMO

Vibrios são Gamaproteobactérias amplamente distribuídas no meio marinho. Algumas espécies estão associadas com o processo de branqueamento de corais. Neste estudo foi realizada a caracterização da diversidade de isolados de *Vibrio shiloi* associados a espécimes de coral *Madracis decactis* e ao poliqueta *Hermodice carunculata*, do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). Obteve-se uma coleção de 46 isolados sendo que 43 provenientes do poliqueta e 3 isolados de espécimes saudáveis do coral, cuja posição taxonômica foi obtida através da análise de sequências dos genes RNAr 16S e *pyrH*. As 46 sequências do gene *pyrH* obtidas se distribuíram em 14 haplótipos e três grupos distintos. Em conjunto, todos os haplótipos encontrados juntamente com todas as sequências do gene *pyrH* de linhagens de *V. shiloi/V. mediterranei* disponíveis no banco de dados Genbank formaram quatro populações distintas. Estas populações pertencem à espécie *V. shiloi/V. mediterranei*, através de análises taxonômicas de hibridização de DNA-DNA. Isolados representativos de *V. shiloi* das populações foram selecionados para a realização de testes de patogenicidade utilizando artêmias. Os isolados 203 e 354 correspondem a população nº 3, enquanto que os isolados 328 e 384 correspondem a população nº 4. Houve variação intra e interpopulacional no potencial patogênico dos vibrios. Pelo menos parte desta variação pode ser explicada pelo potencial patogênico de cada isolado. Os genomas dos isolados 203 e 354 apresentaram tipos diferentes de genes de virulência. Este trabalho ampliou o conhecimento sobre a diversidade de *V. shiloi/V. mediterranei* assim como o entendimento das relações ecológicas entre essa espécie e os hospedeiros *M. decactis* e *H. carunculata*.

**Palavras chave:** *Vibrio shiloi*, *Vibrio mediterranei*, taxonomia, populações, ecótipos, patogenicidade e virulência

## ABSTRACT

Vibrios are Gammaproteobacteria widely spread in marine environment. Some species of vibrios are associated with the bleaching process in corals. In this study, the diversity of isolates of *Vibrio shiloi* associated with the coral *Madracis decactis* and the polichaete *Hermodice carunculata* from the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (ASPSP) was characterized. A collection of 46 isolates was established, being 43 isolated from the polichaeta and 3 isolated from health specimens of corals. The taxonomic position of the isolates was determined by means of sequencing of RNAr 16S and *pyrH* genes. The 46 sequences of *pyrH* from our isolates were distributed in 14 haplotypes being these grouped in 3 different groups. The haplotypes were analysed together with sequences of *pyrH* from all the strains of *V. Shiloi* and *V. Mediterranei* available in the Genbank, and we observed the formation of 4 distinct populations being all part of the *V. Shiloi* /*V. Mediterranei* specie due to the results of the DNA-DNA hybridization analyses. Representative isolates, from two different populations, were selected for the pathogenic bioassays using artemis. The isolates A-203, A-16 and A-180 are from population 4 while the isolates A-328, A-354 and A-384 are from population 1. We observed a variation in the pathogenic potencial between and inside populations. The genome from the strains A-203 and A-354 showed different types of virulent genes. This work advanced the knowledge in the diversity of the specie *V. shiloi*/*V. mediterranei* as well as the understanding in- the ecological relations between this specie and the host *M. decactis* and *H. carunculata*.

**Key words:** *Vibrio shiloi*, *Vibrio mediterranei*, taxonomy, population, ecotypes, pathogenicity and virulence

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

%GC – Conteúdo GC  
 %mol G+C – Conteúdo GC  
 $A_{260}$  – Absorbância a 260 nm  
 $A_{230}$  – Absorbância a 230nm  
 $A_{280}$  – Absorbância a 280 nm  
 BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*  
 $CO_2$  – Dióxido de Carbono  
 DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido deoxiribonucléico)  
 EDTA – *Ethylene- diamine- tetra- acetic acid*  
 EUA – Estados Unidos da América  
 F – Iniciador *forward* (direto)  
 GES – *Ganidiumthiocyanate- EDTA- N- lauryl- sarcosine*  
 HDD – Hibridização DNA – DNA  
 IUCN – International Union of Conservation of Nature  
 LPSN - *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*  
 MA – Meio de cultivo industrial ( *Marine Agar*)  
 MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*  
 MLSA – *Multilocus Sequence Analysis*  
 NaCl – Cloreto de Sódio  
 NCBI – *National Center for Biotechnology Information*  
 OD – Densidade Ótica  
 Pb- Pares de bases  
 PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em cadeia)  
*pyrH* – Uridilato quinase  
 R – Iniciador *reverse* (reverso)  
 RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)  
 RNAr16 – Gene ribossomal 16S  
 Rpm – Rotações por minuto  
 rt PCR – PCR em tempo real  
 SSC – Standard Saline Citrate  
 SYBR- Syber Green  
 TBE – Tris- Borate- EDTA  
 TE – Tampão Tris-EDTA  
 $T_m$  – Temperatura média de desnaturação  
 TSA – Meio de cultivo industrial (*Tryptic Soy Agar*)  
 TSB – Meio de cultivo industrial (*Tryptic Soy Broth*)  
 TCBS - Ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose  
 UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
 $\Delta T_m$  – Diferença entre temperaturas média de desnaturação

**LISTA DE SOLUÇÕES****Solução 1 – Tampão de Ressuspensão**

1,75 g de NaCl 0.15 M  
4,0 ml de EDTA pH 8,0 e 0,5 M  
Completar para 200 mL com água Mili-Q

**Solução 2 – GES**

60 g guanidina-tilglicolato  
20 mL de EDTA 0,5M e pH8,0  
20 mL de água Mili-Q autoclavada  
Aquecer para 65 °C até que dissolva  
Quando a solução estiver a temperatura ambiente acrescentar 1 g de N-lauril-sarcosina  
Completar com água Mili-Q autoclava para 100 mL

**Solução 3 - Acetato de amonia**

57,81 g de Acetato de amonia  
Completar a solução para 100 mL com água Mili-Q autoclavada

**Solução 4 – TBE 5X**

54 g de Tris  
27.5 g de Ácido Bórico EDTA 20mM  
Completar para 1 litro com água destilada

**Solução 5 – Tampão Tris-EDTA**

Tris 10mM e EDTA 100 mM pH 8,0

## SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da estrutura do tecido do coral <i>Oculina Patagonica</i> , demonstrando a associação e localização das bactérias associadas ao muco, ao esqueleto e a cavidade gastrodérmica e das zooxantelas (Modificada de Rosenberg <i>et al.</i> , 2007). .....	19
Figura 2 – Mapa do ASPSP, onde 1 e 2 indicam os pontos de coleta relacionados na Tabela 1. (Retirada de Moreira <i>et al.</i> , 2013). .....	35
Figura 3 - Esquema de como foram montados e analisados os experimentos em placas de 24 poços. ....	52
Figura 4 - Ensaio de patogenicidade com 5 placas, testando 4 linhagens diferentes. Três linhagens com 8 réplicas e 1 linhagem com 6 réplicas. Incubadora com iluminação e temperatura constante de 30°C. ....	52
Figura 5 - Sala experimental do Laboratório de Microbiologia elaborada para a realização de bioensaios de infecção com organismos que se aproximem da fonte de isolamento dos micro-organismos. ....	54
Figura 6 - Árvore filogenética construída com sequências do terço médio do gene RNAr 16S (983 pb) pelo método Neighbor-Joining. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). Foram incluídos 28 isolados e quatro linhagens tipo. O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta <i>H. carunculata</i> e a linhagem tipo <i>V. shiloi</i> . O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral <i>M. decactis</i> . A barra representa 0,5% de divergência entre as sequências. <i>V. cholerae</i> foi usado como grupo externo.....	56
Figura 7 - Árvore filogenética baseada em sequências do gene <i>pyrH</i> (500 pb) incluindo 48 isolados e 20 linhagens tipo. Esta filogenia foi construída pelo método Neighbor-Joining utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. A espécie <i>Alinivibrio salmonicida</i> foi usada como grupo externo. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta <i>H. carunculata</i> e a linhagem tipo <i>V. shiloi</i> . O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral <i>M. decactis</i> (A-328, A-354 E A-384) . A barra representa 2% de divergência entre as sequências. ....	59
Figura 8 - Árvore concatenada construída com sequências parciais dos genes RNAr 16S e <i>pyrH</i> totalizando 1499 pb. Esta filogenia foi construída pelo método Neighbor-Joining utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta <i>H. carunculata</i> e a linhagem tipo <i>V. shiloi</i> . O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral <i>M. decactis</i> . A barra representa 1% de divergência entre as sequências.....	60
Figura 9 - Rede de Haplótipos gerada a partir das sequências do gene <i>pyrH</i> utilizando o software Network 4. 1. 1.2. O tamanho dos ícones designados para cada haplótipo tem relação direta com a frequência de sequências encontradas em cada grupo e sua coloração com a fonte de isolamento. Haplótipos em amarelo a fonte foi o poliqueta <i>H. carunculata</i> ;; Haplótipos em verde: a fonte foi <i>M. decactis</i> ; Haplótipo	

- em azul: linhagem tipo de *V. shiloi*; Haplótipo azul em escuro: linhagem tipo *V. mediterranei*. Em vermelho: número de mutações em dado intervalo que separam os haplótipos.....62
- Figura 10 – Análise das populações de *V. mediterranei*/*V. shiloi* com base em sequências do gene *pyrH* (416pb) e a fonte de isolamento. Fonte de isolamento: CD – Coral; *M. decactis*/ CM -Coral; *M. hispida*/ CO- Coral; *O. patagonica* / PH – Poliqueta; *H. carunculata*/ ML – plâncton marinho/ MS – sedimento marinho/ MA- água do mar/ BC – Ostra; *C. cortestensis*/ BR – Bivalve; *R. philippinarum*/ BE – Bivalve; *M. edulis*/ BT – Bivalve; *O. edulis*/ BX – Bivalve; *Donax sp.*/ BZ – Bivalve; *C. gigas*/ FN – Peixe; *S. anulatus*/ FG – Peixe; *L. guttatus*/ FU - Peixe; *S. aurata*/ FJ – Peixe; Salmão – *A. salmonicida*- grupo externo) ; habitats previstos (5) nos nodos parentais e populações (4) preditas representadas pelos círculos grandes dentro da análise de linhagens do grupo *V. shiloi* / *V.mediterranei*. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método de verossimilhança com bootstrap de 1000 repetições. Para os isolados em estudo (Tabela 1) foi utilizada a divisão de haplótipos (H1 – H14) geradas pelo software DNAsp. As estrelas destacam os haplótipos dos quais linhagens foram selecionadas para a realização dos bioensaios de patogenicidade. A- Apresentação da árvore no formato circular, mostrando o habitat projetado do ancestral para cada linhagem e as populações formadas . B – Apresentação da árvore no formato tradicional mostrando o habitat projetado do ancestral para cada linhagem no nodo parental. A barra representa 1% de divergência entre as sequências. *V. cholerae* foi usado como grupo externo .....65
- Figura 11 – Árvore ultramétrica sumarizando os habitats e as populações associadas identificadas pelo modelo e a composição de cada habitat predito de acordo com os grupos de isolamento [Vida Livre (água do mar, sedimento marinho e plâncton marinho), Bivalve (*M. edulis*, *R. philippinarum*, *O. edulis*, *Donax sp.*, *C. cortestensis* e *C. gigas*), Coral (*O.patagonica*, *M. decactis* e *M. hispida*), Poliqueta (*H. carunculata*) e Peixe (*S. anulatus*, *L. guttatus*, *S. aurata* e Salmão – *A. salmonicida* – grupo externo)]. As cores dos habitats são as mesmas dos círculos grandes da Figura 13. A composição dos habitats pelos grupos de isolamento foi inferida pelo modelo.....66
- Figura 12 - Composição de habitats encontrados pelo modelo de acordo com as espécies das quais as linhagens de *V. shiloi*/*V. mediterranei* foram isoladas. O hospedeiro das linhagens retiradas do GenBank foi identificado de acordo com a fonte informada no banco de dados ou pelo trabalho citado como referência.....67
- Figura 13 - Análise filogenética baseada nas sequências completa do gene *RNAr 16S* (1430 pb).Esta filogenia foi construída pelo método Tamura-Nei utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. A barra representa 5% de divergência entre as sequências. *V. cholerae* foi utilizado como grupo externo.....68
- Figura 14 - Curvas de desnaturação e o respectivo  $\Delta T_m$  obtido ( A: AK1<sup>T</sup>X LMG11258<sup>T</sup> -  $\Delta T_m= 2.55$ , B: AK1<sup>T</sup> x A- 203 -  $\Delta T_m= 0.74$ ; C: AK1<sup>T</sup>x A-354 -  $\Delta T_m=0.36$  , D: LMG11258<sup>T</sup>x A-203 -  $\Delta T_m=0.55$ , E: LMG11258<sup>T</sup>X A-354 -  $\Delta T_m=0.96$  e F: A-203XA-354 -  $\Delta T_m=0.65$ ). Os homólogos são representados com linhas cheias e os híbridos com linhas tracejadas. A ... curva paralela ao eixo X, indica a temperatura na qual foi observada % fluorescência, e portanto as  $\Delta T_{ms}$ .....73
- Figura 15 - Teste de patogenicidade com as linhagens de *V. shiloi* representativa de toda diversidade encontrada dessa espécie no coral *M. decactis* e no poliqueta *H. carunculata*. As linhagens A-384 e A-

354 tiveram um efeito negativo (*) na sobrevivência das artêmias enquanto a linhagem A-203 teve um efeito positivo (**). .....	75
Figura 16 - Coral sofrendo necrose tecidual após dois dias à uma temperatura dois graus acima da temperatura de aclimação (24°C). .....	93

## SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para as etapa das Reações da Cadeia Polimerase para os genes 16 rRNA e <i>PyrH</i> e para o sequenciamento destes mesmos genes.....	39
Tabela 2 - Sequências do gene <i>pyrH</i> retiradas do banco de dados mundial GenBank com a respectiva fonte de isolamento, seu número de acesso e sigla ecológica utilizada para identificá-lo, de modo a gerar o modelo de evolução ecológica pelo software ADAPTML. ....	43
Tabela 4 - Haplótipos encontrados analisando as sequências do gene <i>pyrH</i> geradas a partir dos isolados associados ao poliqueta <i>H. carunculata</i> e a espécimes de <i>M. decactis</i> , juntamente com as sequências das linhagens tipo de <i>V. shiloi</i> e <i>V. mediterranei</i> . ....	61
Tabela 5 - Concentração de DNA, valores das razões entre as absorbâncias a 260, 280 e 230nm (A260/A280; A260/A230) das linhagens utilizadas nos experimentos de $\Delta T_m$ .....	69
Tabela 6 - Valores de $T_m$ e conteúdo %GC obtidos para as linhagens foco e linhagens tipo utilizadas para os experimentos de $\Delta T_m$ . Os valores de %GC foram calculado a partir da fórmula %mol G+C= (1.5617 $T_m$ -77.841) (MOREIRA <i>et al.</i> , 2011). ....	69
Tabela 7- Valores de $\Delta T_m$ obtidos para para as linhagens usadas neste estudo. À esquerda os valores de $\Delta T_m$ em relação aos DNAs homólogos, à direita o $\Delta T_m$ (média dos resultados obtidos aos homólogos)..	70
Tabela 8 - Genes associados a virulência encontrados nos genomas de duas linhagens de <i>V. shiloi</i> descritas neste estudo (A-203 e A-354) , comparando os resultados obtidos com a linhagem tipo <i>V. shiloi</i> AK1 <sup>T</sup> .....	76

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 Arquipélago São Pedro e São Paulo	15
1.2 Estado dos Ambientes Coralíneos	16
1.3 Ameaças Globais	18
1.4 O Holobionte	18
1.5 Branqueamento	20
1.6 Vibrios e a saúde dos corais	20
1.7 Modelo de branqueamento <i>Vibrio shiloi/Oculina patagonia</i>	21
1.8 Taxonomia bacteriana	24
1.8.1 Taxonomia Molecular	25
1.8.2 Conceitos de espécie	28
1.8.3 Taxonomia da espécie <i>V. shiloi</i>	29
1.9 Estrutura populacional e Evolução ecológica	30
1.10 Bioensaios de patogenicidade	32
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1 Identificação de <i>V. shiloi</i>	35
3.1.1 Extração do DNA dos isolados bacterianos	35
3.1.2 Extração por fervura:	36
3.1.3 Extração por Pitcher (PITCHER et al., 1989)	36
3.1.4 Amplificação do gene Uridilato quinase ( <i>pyrH</i> ).	37
3.1.5 Amplificação do gene RNAr 16S	38
3.1.6 Purificação dos amplicons obtidos para os genes RNAr e <i>pyrH</i>	39
3.1.7 Sequenciamento gênico	40
3.1.8 Edição e análise de sequências	41
3.1.9 Alinhamento das sequências e construção das árvores filogenéticas	41
3.2 Análise da Estrutura Populacional e Evolução Ecológica do Grupo <i>V. shiloi</i>	42
3.3 Taxonomia de potencial espécie nova	45
3.3.1 $\Delta T_m$ pelo método fluorimétrico em plataforma RT PCR.	45
3.3.1.1 Extração de alta qualidade em larga escala	45
3.3.1.2 Experimentos para a determinação da %GC e $\Delta T_m$ em plataforma RT PCR	47
3.4 Patogenicidade de isolados do grupo <i>Vibrio shiloi</i>	49

3.4.1	Teste de patogenicidade com artêmias	49
3.4.2	Sala experimental	53
3.5	Análise de genes ligado a virulência de <i>V. shiloi</i> (A-203 e A-354)	54
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1	Análise taxonômica dos isolados de <i>V.shiloi</i> .	55
4.2	Estrutura Populacional do Grupo <i>V. Shiloi/ V. mediterranei</i>	60
4.3	Caracterização da potencial espécie nova irmã de <i>V. shiloi</i>	68
4.4	Patogenicidade de isolados do grupo <i>V.shiloi/V. mediterranei</i>	74
4.5	Genes ligados à virulência das linhagens de <i>V.shiloi</i> (A-203 e A-354)	75
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
5.1	Estrutura populacional do grupo <i>V. shiloi/ V.mediterranei</i>	77
5.2	Refinamento das Análises Taxonômicas das Linhagens a População 1 (A-328, A-354 e A-384)	84
5.3	Ensaio de patogenicidade com isolados representativos do grupo <i>V. shiloi/ V. mediterranei</i>	85
5.4	Análise dos genes de relacionados à virulência	86
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Arquipélago São Pedro e São Paulo

O arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) está localizado a 1.010 Km da costa brasileira, a 520 km do arquipélago de Fernando de Noronha e a 1.872 km da costa Africana entre as coordenadas 00°55,01'N e 029° 20,70' O. É constituído por dez ilhotas que representam o afloramento do manto superior oceânico na superfície devido à forças tectônicas, sendo o único ambiente conhecido que possui esta característica (AMARAL *et al.*, 2002, ARRAIS, 2012). É considerado um lugar inabitável devido à violência dos mares, os possíveis abalos sísmicos, a ausência de água doce e vegetação, à abundância de tubarões e as muitas aves que povoam o lugar (CASAGRANDE *et al.*, 2003). Porém no ano de 1998 foi instalada a primeira estação científica na sua maior ilha (5.380 km<sup>2</sup>) e única passível de ocupação, a Ilha Belmonte. A região vem se mantendo isenta da influência antrópica sofrida pela maioria dos ambientes costeiros (ARRAIS, 2012). Dessa forma o Arquipélago se tornou um laboratório de pesquisa privilegiado devido ao alto grau de endemismo, conservação do ecossistema local e isolamento. Além disso, devido ao seu posicionamento geográfico exerce uma grande influência no ciclo de vida de espécies migratórias, principalmente peixes, crustáceos e aves, sendo considerado uma área de refúgio, descanso, reprodução e alimentação para muitos organismos, incluindo espécies de interesse comercial (CAMPOS, 2004).

Além da importância ecológica e econômica devido a pesca nos seus arredores, o Arquipélago possui uma função estratégica para o território brasileiro. No ano de 1958 as Nações Unidas firmaram a Convenção de Genebra sobre a Plataforma Continental, a Pesca, a Conservação dos Recursos Biológicos do Alto Mar e Mar Territorial, que estabelecia: *“O Estado ribeirinho exerce direitos soberanos sobre a plataforma continental com vistas a sua exploração e utilização de seus recursos naturais”*. Com essa Convenção o oceano foi dividido em zonas às quais estão associados direitos e deveres das nações. Em 1969 um decreto aumentou a Zona de Mar Territorial ou Zona Econômica Exclusiva (ZEE) brasileira para 200 milhas. No ano de 1982, a Convenção de Direitos do Mar estabelecia o “regime de ilhas” que “os rochedos que por si

próprios não se prestam à habitação humana ou à vida econômica não devem ter ZEE nem Plataforma Continental”. Nesta convenção foram acordadas as regras para a conservação do ASPSP como parte do território brasileiro anexando assim 450.000km<sup>2</sup> de área marinha exclusiva ao território brasileiro (ARRAIS, 2012). Deste modo o Brasil passaria a ter 4,5 milhões de km<sup>2</sup> de território marinho exclusivo, sendo estes divididos em área de plataforma continental – que é a extensão natural de um território que fica submersa – e ZEE. Este território marinho recebeu o nome de Amazônia Azul devido ao seu tamanho ser similar àquele ocupado pela Floresta Amazônica. Para satisfazer as exigências da ONU e anexar o território do ASPSP e a área marinha ao seu redor ao território marinho brasileiro, foi construída em 1998 a primeira Estação Científica do ASPSP (CASAGRANDE *et al.*, 2003), que é mantida permanentemente ocupada por pesquisadores e/ou pessoas ligadas a Marinha Brasileira.

Nos quinze anos de estação científica, foram realizados levantamentos da fauna e flora local. Foram catalogadas 31 espécies de algas *Rhodophyta* (BURGOS *et al.*, 2009), 52 espécies de peixes recifais e 64 espécies de peixes pelágicos (VASKE *et al.*, 2005), duas espécies de aves (BENCKE *et al.*, 2005) e 13 espécies de cnidários (AMARAL *et al.*, 2002). Entre os cnidários, três espécies de corais estão presentes, sendo que duas são classificadas como hermatípicas (construtoras de recife), *Madracis dedactis* e *Scolymia wellsi* (LUBBOCK and EDWARDS, 1981, EDWARDS and LUBBOCK, 1983, AMARAL *et al.*, 2002)..

## 1.2 Estado dos ambientes coralíneos

Ambientes coralíneos estão entre os ecossistemas mais diversos e importantes economicamente do planeta, sendo comparados em biodiversidade com a Floresta tropical (SEBENS, 1994) e tendo seu valor econômico avaliado em aproximadamente US\$375 bilhões por ano (COSTANZA *et al.*, 1997) . São responsáveis em grande parte, pela manutenção de atividades da indústria pesqueira e de turismo, fonte de novos compostos químicos além de terem importante papel na proteção da erosão dos ambientes costeiros e serem considerados áreas de refúgio e berçário para diversas espécies de vertebrados e invertebrados (MOBERG and FOLKE, 1999, HOEGH-GULDBERG *et al.*, 2007) . Esse ambiente recobre aproximadamente

0,1- 0,5% da plataforma continental com a área total variando entre 255.000 Km<sup>2</sup> (SPALDING and GRENFELL, 1997), 617.000 Km<sup>2</sup> (SMITH, 1978) e 1.500.000 Km<sup>2</sup> (COPPER, 1994), estando presente na zona costeira de mais de 100 países, sendo que somente 18,7% encontram-se dentro de Áreas Marinhas Protegidas (AMPs). Destas AMPs 5,3% são consideradas reservas extrativistas, 12% reservas com diferentes usos econômicos e somente 1,4% áreas de proteção permanente. No Atlântico Sul aproximadamente 20% das áreas coralíneas encontram-se dentro de Áreas Protegidas, sendo a maior parte dessas áreas na costa brasileira (MOURA, 2006)

Apesar de toda importância econômica e ecológica, a saúde dos ambientes coralíneos vem sendo ameaçada por uma série de fatores estressantes tanto de escala local quanto global. Em escala local podemos citar a influência antrópica afetando diretamente os ambientes costeiros. Com o aumento populacional nessas regiões (cerca de 23% da população mundial vive a no máximo 100Km da costa e a uma altitude inferior que 100 m acima do nível do mar) (SMALL and NICHOLLS, 2003), aumentou o esforço pesqueiro, o despejo de esgoto, de fertilizantes e de poluentes no oceano além do aumento de obras que modificam o hidrodinamismo do local (PARRY *et al.*, 2007, HAAPKYLÄ *et al.*, 2011). A escala global pode ser entendida como o sinergismo das pequenas escalas locais não só nos ambientes costeiros mas também nos terrestres, que vem provocando o aumento da temperatura global (0,6°C no último século), a acidificação dos oceanos (diminuição de 0,1 no pH da superfície do oceano desde 1975) e o aumento nível dos oceanos (1,7+/- 0,05mm/ ano no século 20) (BINDOFF, 2007). A maioria dos estudos são realizados em ambientes próximos a áreas costeiras, havendo assim uma necessidade crescente de entender como os recifes de áreas isoladas se comportam diante de todas as mudanças globais.

Por ser considerado um local pouco impactado ASPSP representa uma importante área para estudo da vitalidade dos corais. Porém há uma ausência de estudos da microbiota associada aos únicos corais hermatípicos da região. Apesar de não ser um ambiente recifal ou coralíneo típico, a distância da costa e a presença de corais, faz deste local um importante ponto de estudo para determinar estressores independente da influência costeira.

### 1.3 Ameaças Globais

O aumento de CO<sub>2</sub> no oceano leva a uma redução direta no pH. Aproximadamente 25% do CO<sub>2</sub> liberado na atmosfera é incorporado aos oceanos (PARRY *et al.*, 2007), onde interage diretamente com a água para produzir o ácido carbônico. O ácido carbônico se dissocia formando bicarbonato na forma de íons e prótons que interagem com carbonatos gerando mais íons bicarbonatos e reduzindo assim a disponibilidade de carbonato para organismos calcificantes (HOEGH-GULDBERG *et al.*, 2007). Uma diminuição da calcificação afeta diretamente a estrutura dos corais devido a uma alteração na densidade do seu esqueleto e na sua taxa crescimento. As consequências são aumento da erosão provocada por animais pastadores, diminuição da complexidade dos recifes e maior susceptibilidade ao hidrodinamismo diminuindo assim sua capacidade de proteção da costa (KLEYPAS *et al.*, 1999).

O aumento da temperatura da superfície dos oceanos pode modificar a susceptibilidade dos organismos a determinados patógenos, devido ao alto gasto energético para manter o sistema imune em pleno funcionamento e lidar com a nova característica ambiental (LAFFERTY and HOLT, 2003). Eventos de anomalia térmica podem ter um efeito drástico sobre os recifes coralíneos desencadeando branqueamento e o aumento da incidência de doenças infecciosas.

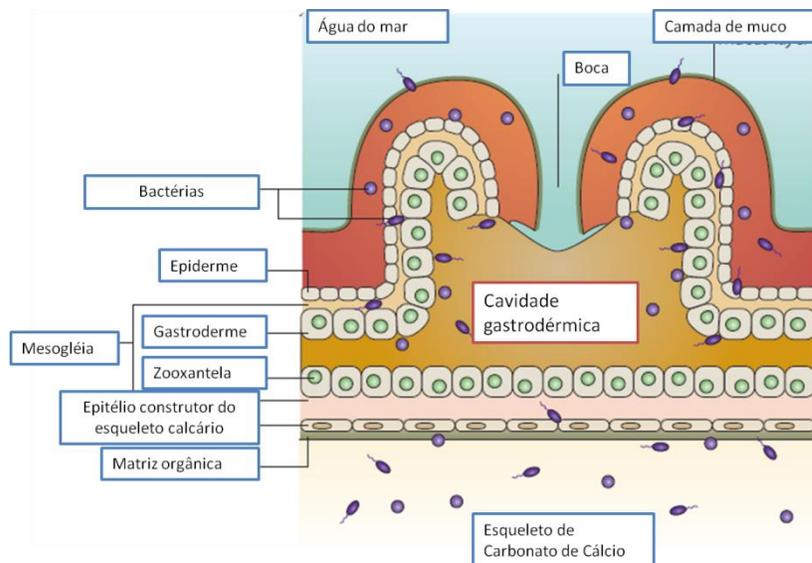
O aumento de temperatura juntamente com a acidificação dos oceanos também leva a uma queda na captação de nitrogênio inorgânico da água. Apesar do aumento da temperatura sozinho aumentar a captação de fósforo, este não pode ser utilizado sem a presença de nitrogênio para a realização de funções metabólicas essenciais para os corais (GODINOT *et al.*, 2011).

### 1.4 O Holobionte

Os corais escleractíneos ou corais duros são os formadores dos recifes. Os corais são considerados holobiontes devido a sua associação com as zooxantelas (dinoflagelados unicelulares do gênero *Symbiodinium*) e a um diverso consórcio de micro-organismos metabolicamente ativos, que provavelmente coevoluíram com o hospedeiro (RESHEF *et al.*, 2006, ROSENBERG *et al.*, 2007, ROSENBERG *et al.*, 2008). As zooxantelas ocorrem em uma densidade de 0.5 a 5 milhões/cm<sup>2</sup> no tecido dos corais e fornecem cerca de 95% do suprimento

de energético diário necessário para o hospedeiro através da liberação de aminoácidos, glicose, glicerol, açúcares, ácidos orgânicos e lipídeos (MUSCATINE, 1967, MUSCATINE, 1990, SUTTON and HOEGH-GULDBERG, 1990, SEBENS, 1994, GATES *et al.*, 1995, GRANT *et al.*, 1997, SMITH *et al.*, 2005).

Os corais albergam uma diversa comunidade de micro-organismos, composta principalmente por bactérias. Essa microbiota fornece inúmeros benefícios ao seu hospedeiro, entre elas podemos citar o aumento da fixação de nitrogênio e carbono (LESSER *et al.*, 2004, CHIMETTO *et al.*, 2008). Segundo a Hipótese Probiótica a abundância relativa dos grupos que compõe a microbiota mudaria com uma alteração ambiental a fim de auxiliar na adaptação a nova situação. Outra função da microbiota seria atuar como um sistema imune ocupando os nichos e espaços disponíveis no holobionte, impedindo assim, estabelecimento de bactérias patogênicas, oportunistas e de organismos incrustantes (KELMAN *et al.*, 2006, RESHEF *et al.*, 2006, RITCHIE, 2006, KVENNEFORS *et al.*, 2012). Entender como ocorre essa dinâmica populacional na comunidade microbiana é uma importante ferramenta de avaliação do estado de saúde dos corais, já que existe uma mudança tanto quantitativa quanto qualitativa na estrutura da população de um coral saudável comparado a um doente (RITCHIE and SMITH, 2004, THURBER *et al.*, 2009).



**Figura 1 – Esquema da estrutura do tecido do coral *Oculina Patagonica*, demonstrando a associação e localização das bactérias associadas ao muco, ao esqueleto e a cavidade gastrodérmica e das zooxantelas (Modificada de Rosenberg *et al.*, 2007).**

### 1.5 Branqueamento

O branqueamento é definido como a perda de coloração do tecido do coral devido a eliminação parcial ou total da zooxantela ou pela degradação do pigmento desta. O tecido de um coral branqueado é translúcido ou transparente e com a perda da zooxantela, o esqueleto calcáreo esbranquiçado fica a mostra (DOUGLAS, 2003). Os mecanismos celulares pelos quais ocorre esta perda podem ser: mudança na fosforilação de proteínas promovendo o desacoplamento das células endodérmicas do coral, necrose, apoptose, autofagia, dano ao fotossistema II e quebra do Ciclo de Calvin no *Symbiodinium* (JONES *et al.*, 1998, SAWYER and MUSCATINE, 2001, DUNN *et al.*, 2002, WARNER *et al.*, 2002, DOUGLAS, 2003). Além de ser o resultado de uma mudança ambiental (estresse abiótico) o branqueamento pode ser desencadeado por uma infecção bacteriana (KUSHMARO *et al.*, 1996, BEN-HAIM and ROSENBERG, 2002).

### 1.6 Vibrios e a saúde dos corais

O gênero *Vibrio* juntamente com outros seis gêneros, pertence à Família *Vibrionaceae*, Classe *Gammaproteobacteria*. Os vibrios são abundantes em ambientes aquáticos sendo encontrados principalmente em estuários, águas costeiras, sedimentos e em sistemas de aquicultura. Compreendem cerca de 10% das bactérias facilmente cultiváveis provenientes de ambientes marinho (EILERS *et al.*, 2000). Podem ser de vida livre ou podem viver como simbioses ou parasitas associados a invertebrados e vertebrados marinhos (THOMPSON *et al.*, 2004). Estudos dependentes e independentes de cultivo demonstraram que vibrios apresentam altas densidades quando associados a organismos marinhos, por exemplo corais (CHIMETTO *et al.*, 2008), peixes (ESPIÑEIRA *et al.*, 2010), moluscos (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2010), esponjas (HOFFMANN *et al.*, 2010) e crustáceos. Os vibrios tendem a dominar a microbiota de organismos em ambientes com alta concentração de nutrientes, temperatura elevada e baixa salinidade (EILERS *et al.*, 2000).

Apesar de integrarem a microbiota de organismos saudáveis, algumas espécies são consideradas patógenas, principalmente de organismos marinhos. Algumas espécies apresentam importância clínica como por exemplo, *V. parahaemolyticus* causador de gastroenterites e *V. cholerae* responsável por epidemias de cólera (ALBERT *et al.*, 1993, DANIELS

*et al.*, 2000). Diversos estudos demonstram a participação de vibrios na saúde dos corais, realizando funções como a fixação de nitrogênio, a degradação de compostos orgânicos sulfatados, degradação de quitina (DUCKLOW and MITCHELL, 1979) produção de substâncias antimicrobiana (RITCHIE, 2006) e proporcionando alimento (KOOPERMAN *et al.*, 2007). Porém o enriquecimento de vibrios no muco e na coluna d'água no entorno dos corais indicam degradação ambiental (DINSDALE *et al.*, 2008). Fatores abióticos, principalmente o aumento da temperatura, podem favorecer variações de *Vibrio spp.*, com impacto sobre a saúde do holobionte (CHIMETTO *et al.*, 2008, RAINA *et al.*, 2009, THURBER *et al.*, 2009). Estudos sugerem que a temperatura tem um papel primordial na regulação não só da densidade populacional mas também na virulência dos vibrios, *V. shiloi* e *V. coralliilyticus*, que foram descritos e caracterizados como agentes etiológicos do branqueamento dos corais *Oculina patagonica* e *Pacillopora damicornis*, respectivamente. Ambos apresentam fatores de virulência regulados por temperatura (KUSHMARO *et al.*, 2001, ROSENBERG *et al.*, 2007, SUSSMAN *et al.*, 2008).

### **1.7 Modelo de branqueamento *Vibrio shiloi*/Oculina patagonia**

Aproximadamente 18 doenças de corais foram descritas, porém o agente etiológico de apenas seis foi identificado (BOURNE *et al.*, 2009). Dentre estes, o caso melhor compreendido é do branqueamento do coral *O. patagonica* pelo patógeno *V. shiloi*, no Mar Mediterrâneo, costa de Israel. Esta infecção ocorre nas estações de primavera e verão, quando a temperatura da água do mar aumenta. Em condições experimentais *V. shiloi* AK1<sup>T</sup> é capaz de causar branqueamento na faixa de temperatura de 20-32°C (KUSHMARO *et al.*, 2001). Os pré requisito para infecção são zooxantelas fotossinteticamente ativas e a presença de um receptor  $\beta$ -D-galactopiranosídeo no muco dos corais (KUSHMARO *et al.*, 1997, KUSHMARO *et al.*, 1998, BANIN *et al.*, 2001). *V. shiloi* é atraído por quimiotaxia pelo muco do coral, se liga aos receptores galactosídeos na superfície e rapidamente penetra no tecido (TOREN *et al.*, 1998). Já dentro das células do coral, *V. shiloi* se multiplica chegando à concentração de  $10^{-8}$  CFU/ cm<sup>3</sup> e se diferencia, passando ao estado “viável-mas-não-cultivável (VBNC)” (estado no qual as células estão metabolicamente ativas mas incapazes de divisão celular e crescimento nos meios de cultura nos quais normalmente cresceriam), começando a produzir a Toxina P, inibidora de

fotossíntese, resultando em perda da zooxantela (OLIVER, 1993, BANIN *et al.*, 2000). A Toxina P (PYPVYAPPPVVP) é um dodecapeptídeo rico em prolina que se liga na membrana da zooxantela e funciona como um canal para a passagem de amônia, reconhecido inibidor de fotossíntese, pois destrói o gradiente de pH ao longo das membranas tilacóides (VELTHUYS, 1980, BANIN *et al.*, 2001, BANIN *et al.*, 2002). Outra importante proteína produzida pelo *V. shiloi* é a superóxido dismutase (SOD) que neutraliza as espécies reativas de oxigênio, sendo por isso um fator chave para a sobrevivência dentro do coral durante a realização da fotossíntese pelas zooxantelas (BANIN *et al.*, 2003). A expressão da SOD é regulada pela temperatura. Em condições experimentais a enzima é produzida a 30°C, mas não a 16°C. Células mutantes SOD<sup>-</sup> foram capazes de aderir, infectar e se multiplicar intracelularmente nos corais. Porém após 50h não puderam mais ser detectadas. A impossibilidade do *V. shiloi* de sobreviver nas células dos corais nos meses de outono/inverno permite a recuperação das zooxantelas pelos corais. Também em condições experimentais foi verificado que os demais fatores de virulências são regulados por temperatura (BANIN *et al.*, 2002, BANIN *et al.*, 2003).

Israely *et al.*, 2001 utilizaram anticorpos para demonstrar a presença de *V. shiloi* nos tecidos de todos os corais branqueados durante o verão, mas a bactéria não foi detectada nos corais saudáveis e branqueados durante o inverno. Ainda em laboratório foi verificado que após a infecção por *V. shiloi*, à temperatura de 28°C, a redução gradual da temperatura aos valores observado no inverno (16°C) resultava em morte e/ou lise celular. Este resultado indica que é necessário uma nova infecção a cada primavera, não uma ativação das células em estado de dormência ainda presentes no tecido (SUSSMAN *et al.*, 2003). Depois de analisar amostras de água do mar, sedimento e organismos marinhos, durante o inverno, foi descoberta a presença de *V. shiloi* no poliqueta *Hermodice carunculata* (verme-de-fogo), que é um predador de corais com preferência por juvenis e larvas (WOLF and NUGUES, 2013). A utilização da análise de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), com oligonucleotídeos específicos para *V. shiloi* permitiu a verificação da discrepante diferença entre contagens obtidas através de cultivo (CFU/mL) e aquelas identificadas pela sonda, indicando que a maioria das bactérias dentro do poliqueta (~99,9%) estariam no estado VBNC. O *V. shiloi* seria capaz de penetrar no tecido do poliqueta no período de temperaturas mais elevadas e em condições ambientais desfavoráveis, entraria

no estado VBNC. Mas diferentemente do que ocorreu em corais, as bactérias seriam capazes de se manter durante as estações mais frias associadas ao poliqueta. O aquecimento promoveria a ativação dos fatores de virulência do *V. shiloi* e o poliqueta, durante a predação, por contato direto, favoreceria a migração das bactérias para os corais (SUSSMAN *et al.*, 2003). Deste modo ficou esclarecido o papel do verme-de-fogo como reservatório e vetor do patógeno *V. shiloi*.

Porém desde o ano de 2004 *V. shiloi* não vem mais sendo encontrado associado com corais branqueados e saudáveis durante o verão no Mar Mediterrâneo, costa de Israel. No ano de 2006, Reshef e colaboradores repetiram os mesmos experimentos de infecção em laboratório realizados anteriormente por Banin e colaboradores (2001) e observaram que o *V. shiloi* mantinha a capacidade de aderir à superfície do coral e penetrar na exoderme, mas não a de se manter nos tecidos do coral. Após 24 horas de experimento era possível observar um declínio na concentração de células bacterianas nos tecidos e após 96 horas não era mais possível detectar a presença da bactéria. As conclusões retiradas desse experimento resultaram na geração da Hipótese Probiótica. Devido a uma modificação da composição da microbiota de *O. patagonica*, a nova estrutura populacional de micro-organismos seria capaz de produzir compostos que provocariam a lise das células do *V. shiloi* impedindo assim seu estabelecimento no coral (RESHEF *et al.*, 2006).

No ano de 2005, Ainsworth e colaboradores, utilizaram FISH e não detectaram *V. shiloi* nos corais saudáveis e branqueados durante o branqueamento anual de *O. patagonica* no Mediterrâneo (AINSWORTH *et al.*, 2008). A principal crítica deste trabalho ao modelo de branqueamento *V. shiloi/O. patagonica* é a continuidade dos eventos de branqueamentos anuais, independente da presença de *V. shiloi*, demonstrando que a causa do branqueamento é a temperatura. Também criticaram o modelo por haver sido formulado com base em experimentos de laboratório, carecendo de observações de campo. Porém no primeiro trabalho no qual foi descrito o processo de branqueamento do coral *O. patagonica*, Kushmaro e colaboradores (1997) sugeriram que os corais poderiam desenvolver resistência específica à infecção e o branqueamento provocado por esta bactéria seria um estágio intermediário entre a perda da zooxantela sensível ao novo impacto ambiental (*V. shiloi*) e a aquisição de um grupo

mais resistente (KUSHMARO *et al.*, 1997). A Hipótese Probiótica endereça essa questão descrevendo a aquisição de resistência via microbiota (RESHEF *et al.*, 2006).

### **1.8 Taxonomia bacteriana**

A taxonomia ( *táxis* – arranjo; *nomia* – método) é a ciência de identificar, classificar e nomear os seres vivos. Um dos primeiros taxonomistas de que temos registros foi o filósofo grego Aristóteles (384- 322 A.C.) e ainda hoje usamos alguns dos agrupamentos propostos por ele (ex: grupos vertebrados e invertebrados). A taxonomia utilizada atualmente é baseada na proposta de Carl Linneus (1707- 1078) responsável pelo desenvolvimento da nomenclatura binomial, onde cada nome é composto por um gênero e um epíteto específico. A classificação é a descrição dos novos taxa, com o ordenamento de organismos em grupos taxonômicos com base na semelhança entre eles. A nomenclatura é a definição do nome do organismo seguindo as regras da nomenclatura binomial. A identificação é a alocação de organismos dentro de taxa previamente classificados (SILVA, 2012).

A taxonomia bacteriana inicialmente era baseada nos caracteres morfológicos observados ao microscópio. Para isso, foi necessário primeiramente o cultivo de micro-organismos em culturas puras. O passo se deu principalmente devido ao trabalho publicado por Koch em 1881 no qual descrevia o cultivo de isolados em meio sólido, foi o pioneiro. A partir deste trabalho, foram desenvolvidos diversos testes fenotípicos para melhor descrever esses organismos, fazendo com que a taxonomia de micro-organismos fosse baseada principalmente nos caracteres morfológicos e fisiológicos.

O número de testes que estavam sendo realizados e a falta de regras comuns para a realização das análises taxonômicas resultava em confusão. A Taxonomia Numérica surgiu em seguida, com a era computacional, e objetivava facilitar a análise das grandes tabelas geradas a partir dos resultados dos inúmeros testes, a fim de gerar uma taxonomia padronizada. No início dos anos 60 com o aumento de informações sobre o DNA e o surgimento de técnicas moleculares foi aventada a possibilidade de as bactérias serem melhor classificadas através da análise do seu genoma (ROSSELLÓ-MORA and AMANN, 2001). Porém somente nos anos 70, com o trabalho de Rita Colwell (COLWELL, 1970), ocorreu a consolidação de uma taxonomia que

não levava em conta somente caracteres morfológicos e fisiológicos, mas assimilava todos os níveis de informação, desde o ecológico até o molecular. A esta nova abordagem deu-se o nome de Taxonomia Polifásica, tendo sido uma divisora de águas na taxonomia dos procariontes.

### 1.8.1 Taxonomia Molecular

Inicialmente as análises moleculares levavam em conta o conteúdo de guanina e citosina dos genomas (%mol G+C). Apesar desta análise ser uma ferramenta importante para a separação de grupos, a separação obtida não necessariamente indica uma relação entre os organismos (ROSSELLÓ-MORA and AMANN, 2001). Nesse contexto surgia a técnica de hibridização DNA-DNA que era capaz de fazer agrupamentos bem definidos e, juntamente com os testes morfológicos e bioquímicos gerava uma taxonomia robusta e homogênea, acabando assim com muitas dúvidas em relação à classificação de determinados grupos. Rapidamente esta técnica tornou-se padrão para a descrição de espécies bacterianas. Em meados dos anos 80 Carl Woese (WOESE, 1987) discutiu a eficiência do uso de cronômetros filogenéticos para a identificação bacteriana. Estes cronômetros são genes que evoluem em taxa similar à taxa de surgimento de novas espécies. Um bom cronômetro molecular para Woese, é o gene RNAr 16S que codifica a menor subunidade ribossomal (16S) de procariotos. Este gene está presente em todas as bactérias, sua estrutura secundária é formada por diferentes domínios que evoluem a diferentes taxas, alguns mais rapidamente e outros mais conservados, permitindo assim que as relações filogenéticas possam ser medidas, incluindo as mais distantes.

Ainda nos anos 80 cientistas se reuniram com o intuito de gerarem uma definição para uma espécie de procariotos. Com base nos dados experimentais gerados até então, definiram que linhagens da mesma espécie têm uma similaridade de 70% ou mais na hibridização DNA-DNA (HDD) e 5°C ou menos na diferença entre as temperaturas médias de desnaturação térmica dos DNAs de referência e híbrido ( $\Delta T_m$ ). As características fenotípicas devem estar de acordo com esta definição (WAYNE *et al.*, 1987). O trabalho de Stackebrandt e Goebel (STACKEBRANDT and GOEBEL, 1994) definiu a relação entre a similaridade de sequências do gene RNAr 16S e os valores de HDD, também com base nos dados experimentais disponíveis até então: linhagens que possuem similaridade de 70% ou menos de HDD apresentam menos que 97% de similaridade nas suas sequências do gene RNAr 16S e são consideradas espécies

diferentes. No entanto, devido a alta conservação da estrutura primária do gene RNAr 16S, sua resolução é limitada quando necessitamos diferenciar espécies intimamente relacionadas (STACKEBRANDT and GOEBEL, 1994), por isso o sequenciamento de outros marcadores moleculares vem sendo adotado. Geralmente é utilizado o sequenciamento de genes “*house keeping*”, aqueles que codificam proteínas essenciais para o metabolismo celular. Dentre esses genes podemos citar: *recA* - recombinação e reparo aos danos do DNA; *pyrH* – uridilato quinase (envolvido na síntese de nucleotídeos); *gapA* – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e *ftsZ*- gene envolvido na divisão celular. Estes genes estão amplamente distribuídos nos genomas, apresentam somente uma cópia e possuem boa resolução taxômica em nível de espécie (SAWABE *et al.*, 2007, THOMPSON *et al.*, 2007).

Um exemplo da limitação do gene RNAr 16S ocorre na família *Vibrionaceae*, onde o gene RNAr 16S é informativo até o nível de gênero. Entre as espécies irmãs dentre as que compõem o “*Vibrio core group*” (*Vibrio harveyi*, *V. communis*, *V. campbellii*, *V. rotiferanus* e *V. alginolyticus*) a similaridade entre as sequências do gene RNAr 16S é maior que 97.6%, e em alguns casos a similaridade de HDD chega próximo aos 70% (PASCUAL *et al.*, 2010). Para melhor definição taxonômica deste gênero, Thompson e colaboradores, utilizaram o gene *pyrH* (uridilato quinase) e obtiveram uma melhor resolução entre as espécies altamente relacionadas em comparação com os resultados obtidos com as sequências do gene RNAr 16S (99%). Além de ser discriminatório a similaridade deste gene também possui uma correlação positiva com análises de HDD. Para uma mesma espécie a similaridade das sequências do gene *pyrH* deve ser maior que 94% e estas devem formar um ramo filogenético independente, agrupando com a linhagem tipo (THOMPSON *et al.*, 2005, THOMPSON *et al.*, 2009).

No ano de 2002 o Comitê Internacional para a Sistemática de Procariotos se reuniu afim de avaliar as novas técnicas que haviam sido propostas em diversos trabalhos para uso na taxonomia bacteriana. Apesar das inovações que contribuiram para o avanço da taxonomia, a técnica de HDD, que vem sendo utilizada nos últimos 40 anos, continuou sendo o padrão ouro para a identificação de espécies bacterianas, uma vez que é boa sua amplitude para revelar as relações entre os microrganismos (WAYNE *et al.*, 1987, STACKEBRANDT *et al.*, 2002). A análise que orienta a escolha das linhagens a serem comparadas nos ensaios de HDD é a filogenia

baseada no gene RNAr 16S completo. A técnica de HDD consiste na fixação de DNA de fita simples de alta massa molecular em um suporte sólido, para posterior incubação na presença de DNA fita simples de baixa massa molecular marcado. Quanto maior a semelhança entre o DNA fixado e o DNA marcado, maior será a hibridização entre eles e maior será o sinal da marcação utilizada. Linhagens de uma mesma espécie possuem 70% ou mais de hibridização DNA-DNA (WAYNE *et al.*, 1987). As desvantagens desse método são o tempo gasto, a complexidade para o preparo do DNA marcado, além do alto custo. Segundo Willems e colaboradores (WILLEMS *et al.*, 2001) são necessários no mínimo duas semanas para o preparo dos testes para 4 linhagens.

Uma alternativa para o método clássico de hibridização DNA-DNA é o uso da plataforma de PCR em tempo real (rtPCR) para a avaliação fluorimétrica da similaridade entre genomas completos, com base na desnaturação térmica do DNA. O método de desnaturação é utilizado para medir a instabilidade térmica do DNA heterólogo *versus* o DNA homólogo. Sob condições estáveis e controladas a desnaturação do DNA dupla fita ocorre principalmente devido a temperatura (GONZALEZ and SAIZ-JIMENEZ, 2005). A temperatura na qual ocorre a desnaturação (passagem de fita dupla à única) de 50% do DNA dupla fita inicial é chamada de temperatura média de desnaturação ( $T_m$ ). O parâmetro utilizado para relacionar os DNAs é a diferença entre as  $T_{ms}$  do DNA homólogo de referência e do híbrido construído com o DNA de referência e o da amostra, denominada  $\Delta T_m$  (LEY *et al.*, 1970). Para a medição do grau de desnaturação, os DNAs são marcados com o fluoróforo Syber Green I (SYBR) que possui afinidade específica por DNA dupla fita. Desta forma o valor de fluorescência máxima é medido à temperatura ambiente, e este valor decai proporcionalmente ao aumento da temperatura conforme a desnaturação vai ocorrendo. A fluorescência, atinge o valor nulo quando todo o DNA se encontra na forma de fita única. O valor de 50% de fluorescência indica o valor da  $T_m$  do DNA estudado (GONZALEZ and SAIZ-JIMENEZ, 2005). O DNA híbrido contém um número menor de bases pareadas que o DNA homólogo (menor número de pontes de hidrogênio), por isso tem menor estabilidade térmica atingindo sua  $T_m$  mais rapidamente que o DNA homólogo (ROSSELLÓ-MORA and AMANN, 2001). O método foi implementado no Brasil (Lab. De Microbiologia – UFRJ) e padronizado para distinção de *Vibrio spp.* Por Moreira e colaboradores

(2013) e vem sendo aplicado para a descrição de novas espécies com sucesso: *V. maritimus*, *V. variabilis* e *V. alfacensis* (CHIMETTO *et al.*, 2011, GOMEZ-GIL *et al.*, 2012)

A plataforma de PCR em tempo real também pode ser utilizada para a medição do conteúdo de GC (%mol G+C) do DNA, que é um dos parâmetros taxonômicos empregados na descrição de espécies de procariotos (ROSSELLÓ-MORA and AMANN, 2001). A porcentagem de GC é também essencial para a determinação da temperatura de renaturação térmica, importante para a construção dos híbridos (ZAHA, 2003) usado nos experimentos de  $\Delta T_m$ . Quanto maior o conteúdo GC maior a energia (temperatura) necessária para a abertura das duplas fitas, devido as três ligações existentes entre as bases Guanina e Citosina enquanto entre as bases Adenina e Timina existem somente duas. É possível determinar a %mol G+C a partir das  $T_{ms}$  obtidas pela desnaturação térmica do DNA marcado, com SYBR, em plataforma rt PCR, com a fórmula [%GC=(1,98XT<sub>m</sub>) – 106,91] (GONZALEZ and SAIZ-JIMENEZ, 2002). Moreira e colaboradores (MOREIRA *et al.*, 2011) redefiniram esta equação para a determinação do conteúdo GC de linhagens do gênero *Vibrio*: [%GC=(1,5617xT<sub>m</sub>)-77,841] (R<sub>2</sub>= 0,9441). O conteúdo GC em procariotos varia de 20% a 80%. A variação máxima esperada para o conteúdo GC no âmbito de gênero é de 15%, no âmbito de espécie é de 5% (ROSSELLÓ-MORA and AMANN, 2001).

Uma mesma espécie, então, seria definida por linhagens que apresentassem mais de 70% de HDD entre si ou diferença menor que 5°C na temperatura média de desnaturação do DNA híbrido das duas espécies para o homólogo de cada uma (WAYNE *et al.*, 1987, STACKEBRANDT *et al.*, 2002) sendo este valor equivalente à uma similaridade maior que 97% nas sequências do gene RNAr 16S (STACKEBRANDT and GOEBEL, 1994).

### 1.8.2 Conceitos de espécie

A delimitação de espécies bacteriana é baseada principalmente nas características genotípicas, que vêm sendo utilizada como principal forma de agrupamento (COHAN, 2001, VOS, 2011). Porém mesmo as técnicas moleculares apresentam limitações, e em algumas situações não conseguem diferenciar espécies intimamente relacionadas (FRASER *et al.*, 2009). Por exemplo: para *V. cholerae* e *V. mimicus* o valor determinado de HDD foi de 79% e a

similaridade na sequência do gene RNAr 16S foi de 99,6%, portanto valores não discriminatórios (THOMPSON *et al.*, 2003).

Segundo o conceito ecológico de espécie, estas iriam além de somente grupamentos de organismos intimamente relacionados ou organismos muito similares. Espécies diferentes seriam capazes de explorar nichos ecológicos diferentes e a diversidade ecológica entre as populações seria controlada por uma ou mais forças de coesão (MEGLITSCH, 1954, VAN VALEN, 1976, COHAN, 2001). Espécies diferentes seriam separadas por diferentes histórias evolutivas sendo assim livres para divergir sem que as forças coesivas de outras espécies interferissem na sua evolução ecológica.

A partir da teoria ecológica de espécie surgiu o conceito de ecótipo, que seria um grupo de linhagens utilizando o mesmo (ou similar) nicho ecológico e que poderiam ser identificadas como um grupo monofilético. Um novo ecótipo resultaria de um mutante, portador de uma vantagem adaptativa, capaz de extinguir por competição todas as demais linhagens da população original (ecótipo original), o que não ocorreria com linhagens de ecótipos diferentes (COHAN, 2002). Essa vantagem pode ser capacidade de metabolizar um recurso diferente, por exemplo. Um ecótipo expandiria sua diversidade através do acúmulo de mutações e recebendo genes de outros ecótipos, porém a divergência se torna permanente, quando o novo mutante consegue escapar dos eventos de seleção periódicos que incidem sobre o ecótipo ancestral. Após esta etapa cada ecótipo poderia ser considerado uma possível espécie já que estes seriam unidades evolutivas irreversivelmente separadas e que possuiriam suas próprias tendências e história evolutiva (COHAN, 2001).

### **1.8.3 Taxonomia da espécie *V. shiloi***

A bactéria *V. shiloi* foi descrita por Kushmaro e colaboradores (2001) como sendo o patógeno responsável pelo branqueamento do coral *O. patagonica* no Mar Mediterrâneo em Israel. A espécie irmã de *V. shiloi* é *V. mediterranei*, sendo 72% o valor determinado de HDD entre ambas, e 99,4% a similaridade nas suas sequências do gene RNAr 16S. Apesar do valor de HDD ser >70%, o nome, *V. shiloi* foi validado com base na composição de ácidos graxos e por haver sido caracterizado como patógeno intracelular do coral *O. patagonica*, condição singular

dentre vibrios (KUSHMARO *et al.*, 2001). Porém neste mesmo ano Thompson e colaboradores contestaram este estudo afirmando que *V. shiloi* é sinonima de *V. mediterranei*, pois não observaram a diferença na composição de ácidos graxos descrita por Kushmaro e colaboradores e por julgarem que a virulência não é parâmetro taxonômico para descrever uma nova espécie, além de mencionarem que em diversas espécies de *Vibrio* é possível verificar a presença de linhagens virulentas e não virulentas (KUSHMARO *et al.*, 2001, THOMPSON *et al.*, 2001)

### **1.9 Estrutura populacional e Evolução ecológica**

Populações bacterianas possuem uma discreta variação na diversidade de sequências de genes “house keeping” (codificadores de funções essenciais). Geralmente a média de divergência entre as sequências de uma mesma população é de 1% ou menos e a divergência entre sequências de populações diferentes seria em média 2% ou mais (PALYS *et al.*, 1997). Essa baixa diversidade encontrada é moldada principalmente pelos eventos de seleção periódicos. De tempos em tempos a seleção atua purgando a diversidade de todos os *loci* tornando assim a população homogênea e sempre selecionando o genótipo melhor adaptado as condições (COHAN, 2001, FRASER *et al.*, 2009).

Na literatura podemos encontrar diversos modelos que explicariam a evolução das populações bacterianas, dentre eles podemos citar: (1) O modelo de ecótipo estável:, onde uma única linhagem de bactéria se diferencia em duas sublinhagens, que se diferenciam em alguns aspectos da sua ecologia. A seleção natural periódica, em determinado momento elimina toda a diversidade que surgiu desde a última seleção (a diversidade é purgada pela seleção) e como as populações que se originam das duas sublinhagens são ecologicamente distintas, a seleção periódica de uma população não influencia na outra e vice versa, fazendo com que cada ecótipo possa se diferenciar e divergir para se tornar uma nova espécie; (2) metapopulação: determinado nicho ecológico está vazio ou aleatoriamente é ocupado por determinada linhagem proveniente de outro nicho. Com isso esta linhagem pode colonizá-lo e por fim diversifica-se. Uma característica desse tipo de população é que o novo nicho colonizado rapidamente não consegue mais suportar a população crescente e toda a população é eliminada. Esse tipo de evolução é comum entre patógenos, pois invadem um hospedeiro porém são forçados a ir embora ou morrem devido ao desenvolvimento do sistema imune do

hospedeiro; (3) modelo neutro em uma população pequena: diferentes genótipos surgem por recombinação e mutação e aumentam ou diminuem sua densidade de acordo com a deriva gênica; e por fim (4) dinâmica de predador – presa/ população “*bottleneck*” : uma população pode diminuir drasticamente seu tamanho. Neste caso fagos podem provocar oscilações aleatórias ou periódicas no tamanho populacional de bactérias. Neste modelo a população que surge logo após a diminuição drástica pode ser formada por descendentes de uma só linhagem (FRASER *et al.*, 2009).

Um dos maiores desafios dos modelos que envolvem a estrutura de ecótipos é a evolução bacteriana provocada pela recombinação homóloga. Recombinação ocorre em arqueias e bactérias e envolvem a troca de pequenos pedaços de DNA com o segmento homólogo de outra linhagem. A recombinação se torna menos provável com o aumento da divergência das sequências do doador e receptor, porém bactérias podem realizar recombinação com sequências que divergem em até 25% (COHAN, 2001). Ao mesmo tempo que a recombinação é um importante meio de adaptação, esta pode atuar homogeneizando a diversidade de genótipos de linhagens que ocupam nichos diferentes. Porém os eventos de recombinação são raros e promíscuos fazendo com que esta não consiga esconder por completo a diversidade ecológica de populações intimamente relacionadas (RETCHLESS and LAWRENCE, 2007, WIEDENBECK and COHAN, 2011). Didaticamente, o genoma bacteriano pode ser classificado como, o genoma “*core*”, que codifica funções fundamentais compartilhadas entre todas as linhagens de uma mesma espécie, e o genoma auxiliar ou acessório que é composto por genes e operons que não necessariamente estão presente em todas as linhagens e podem ser responsáveis por determinar propriedades ecológicas específicas de cada organismo. Estima-se que 40% dos genes de determinado organismo são adaptativos (FRASER *et al.*, 2009).

Hunt e colaboradores (2008) desenvolveram o software ADAPTML para verificar se existia uma partição de recursos na coluna d’água para o gênero *Vibrio*, utilizando sequências do gene *hsp60*. Observaram que algumas populações apresentavam altos níveis de especialização, como o *V. ordalii* que apresentou hábito de vida somente livre e outras extremamente generalistas colonizando a coluna d’água e uma variedade de superfícies, incluindo partículas orgânicas e zooplâncton. Também se verificou que a maioria das populações preditas pelo modelo, seriam

divergentes há um longo período evolutivo, indicado pela profundidade dos ramos, que e os grupos filogenéticos formados geralmente condizem com a divisão de espécies dentro desse gênero. No entanto *V. splendidus* parece ser uma exceção, pois suas linhagens se dividem em inúmeros grupos intimamente relacionados com preferências ecológicas distintas, indicando possível recente radiação ecológica de uma população simpátrica ancestral.

Analisar a relação entre filogenia e a diferenciação ecológica é um passo crítico para entender o mecanismo de especiação em bactérias (FRASER *et al.*, 2007). Entender qual a fração de determinado gene em que ocorrem variações provocadas pelas seleções adaptativas e não por mutações e deriva gênica e qual a função que essas variações desempenham no funcionamento do ecossistema é uma das questões centrais da microbiologia (COLEMAN and CHISHOLM, 2010).

#### **1.10 Bioensaios de patogenicidade**

Bioensaios para investigação de patogenicidade são amplamente usados para diversas finalidades incluindo a manutenção de algumas atividades econômicas. Um grande impulsionador da difusão dos bioensaios é a aquicultura, pois os testes indicam espécies patogênicas em potencial, que causariam mortalidade em criadouros de peixes, crustáceos e moluscos (LIGHTNER and REDMAN, 1998). As infecções bacterianas em espécies marinhas de criadouros são causadas principalmente por bactérias do gênero *Vibrio* (TORANZO *et al.*, 2005). Alguns organismos modelos são usados em experimentos pilotos para a identificação de potenciais patógenos. Dentre os organismos mais utilizados podemos citar *Drosophila sp.* (ALVES JR *et al.*, 2010) e nauplios de *Artemia sp.* (AUSTIN *et al.*, 2005). Segundo Austin e colaboradores, 2005, *Artemia sp.* é um organismo modelo robusto para ensaios de patogenicidade que envolvem bactérias do gênero *Vibrio* devido a sensibilidade de sua larva a infecções provocada por esse grupo. Além de serem um importante modelo para experimentos de infecção artêmias são importante ferramenta no tratamento das doenças provocadas em criadouros pois podem ser utilizadas como vetores de substâncias probióticas, nutrientes e antibióticos para larvas de peixes diminuindo assim sua mortalidade por infecções bacterianas (DEFOIRDT *et al.*, 2005, TOURAKI *et al.*, 2013). Cada artêmia é capaz de ingerir de  $10^2$  a  $10^4$  CFU

de bactéria variando de acordo com a concentração ( $10^6$  a  $10^8$ ) e linhagem inoculada. Porém o que determina a patogenicidade de determinada linhagem são as substâncias extracelulares que é capaz de produzir (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

Diversas espécies do gênero *Vibrio* já foram utilizadas em ensaios de patogenicidade utilizando artêmias. As principais espécies de víbrios cujas linhagens testadas provocaram alta taxa de mortalidade nesse modelo foram: *V. brasiliensis*, *V. coralliilyticus*, *V. azuræ*, *V. fortis*, *V. kanaloaei*, *V. neptunius*, *V. rotiferanus*, *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. proteolyticus* (RICO-MORA and VOLTOLINA, 1995, VERSCHUERE *et al.*, 2000, AUSTIN *et al.*, 2005). Linhagens de algumas espécies provocaram danos físicos causando mortalidade eventual das artêmias: *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. gallicus*, *V. gigantis*, *V. hepatarius*, *V. hispanicus*, *V. lentus*, *V. nereis*, *V. pacini*, *V. pomeroyi*, *V. xuii*, *V. superstes*, *V. tasmaniensis* e *V. shiloi* (AUSTIN *et al.*, 2005). No entanto, a linhagem de *V. shiloi* (LMG20977 = AK2) utilizada nos ensaios de patogenicidade por Austin e colaboradores (2005), posteriormente foi classificada através de análises moleculares e fenotípicas como *V. harveyi* (GOMEZ-GIL *et al.*, 2004, AUSTIN *et al.*, 2005).

Após esse primeiro experimento realizado com um organismo modelo de fácil acesso e cujos resultados são passíveis de comparação com aqueles descritos na literatura, o próximo passo seria utilizar as bactérias que causaram mortalidade significativa nesses organismos para a realização de bioensaios utilizando como modelo o organismo do qual a bactéria foi isolada. Para a confirmação de que determinado micro-organismo é o agente causador de uma doença, é necessário atender os postulados de Robert Koch (1882). São quatro passos que devem ser satisfeitos: 1 – O micro-organismo deve ser isolado do organismo debilitado e deve crescer em culturas puras sob as condições laboratoriais; 2 – O micro-organismo isolado deve ser capaz de iniciar a doença quando inoculados em organismos saudáveis; 3 – O micro-organismo deve ser re-isolado do organismo recém infectado e identificado com sendo o mesmo micro-organismo inoculado previamente e 4 – o micro-organismo deve ser observado com sempre sendo o agente causador desta doença.

## 2. OBJETIVOS

- Identificar *V. shiloi* associado ao coral *M. decactis* (saudável e branqueado) e ao poliqueta *H. carunculata*;
- Caracterizar as populações de *V. shiloi*/*V. mediterranei* do ASPSP assim como a formação de possíveis ecótipos;
- Analisar o potencial patogênico de isolados representativos de *V. shiloi*/*V. mediterranei* e
- Analisar genes associados à virulência de *V. shiloi*/*V. mediterranei*.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material e isolamento foram feitas pela doutoranda Ana Paula B. Moreira, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Genética, da UFRJ (Moreira et al. 2013). As linhagens selecionadas para este estudo estão relacionadas na Tabela 1. A coleta foi realizada nos dias 18, 19, 20 e 22 de setembro de 2010 em dois pontos da enseada do ASPSP (Figura 2). Durante as coletas do ponto 2 foi observado grande número de poliquetas da espécie *H. carunculata* infestando colônias de *M. decactis*. Também foi observado um rastro de branqueamento ao longo da sua trajetória de deslocamento sobre os corais.

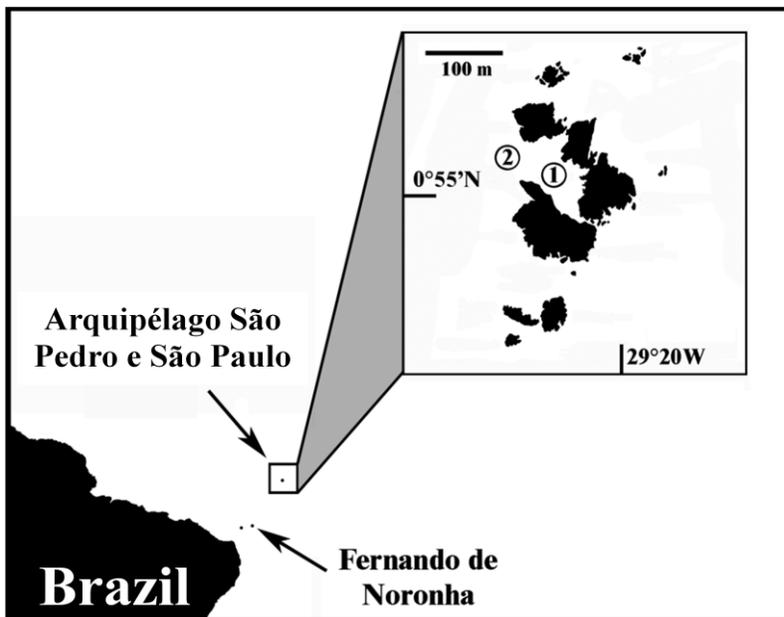


Figura 2 – Mapa do ASPSP, onde 1 e 2 indicam os pontos de coleta relacionados na Tabela 1. (Retirada de Moreira *et al.*, 2013).

### 3.1 Identificação de *V.shiloi*

#### 3.1.1 Extração do DNA dos isolados bacterianos

Para esta etapa foram realizadas dois tipos de extração de DNA; extração por fervura e ou extração seguindo o método de Pitcher (PITCHER *et al.*, 1989). O primeiro método é mais prático e rápido, consistindo apenas na extração do DNA pelo rompimento das células por fervura em água estéril. Entretanto a solução com o DNA obtida contém muitas impurezas, uma vez que nenhuma etapa de remoção dos restos celulares foi realizada. O segundo método é mais demorado (aprox. 4 horas) porém o DNA obtido é de melhor qualidade devido ao uso de detergentes que rompem a parede celular das bactérias e suas membranas e solventes orgânicos, que separam a fase aquosa (contendo o DNA) da fase orgânica. Desta forma foi feita primeiramente a extração de DNA por fervura. A extração de Pitcher foi utilizadas somente para os isolados dos quais não se obteve DNA suficiente pelo método de fervura.

### 3.1.2 Extração por fervura:

Uma pequena quantidade de células foi fervida em 100 µL de água Miliq autoclavada por 15 minutos a 105 °C. Foi utilizado o banho seco contendo água nos poços nos quais os eppendorfs foram colocados.

### 3.1.3 Extração por Pitcher (PITCHER et al., 1989)

Para as linhagens que obtivemos o DNA pelo método de fervura e que não conseguimos a amplificação do gene desejado foi feita a extração pelo método de Pitcher. Esta extração consiste em: Pegar uma pequena quantidade de célula com uma alça estéril e lavá-las com 500 µL de tampão de ressuspensão (Solução **1**), centrifugar por 3 minutos a 13.200 rpm e retirar o sobrenadante. Centrifugar rapidamente novamente (>1minuto) e retirar o sobrenadante. Ressuspender o material sedimentado em 100 µL de TE 1X 3% NaCl pH 8,0 e vortexar até a solução ficar homogênea. Para as próximas etapas as amostras devem ser mantidas em gelo. Acrescentar 500 µL de GES (Solução **2**), homogeneizar suavemente. A solução ficará transparente e viscosa. Nesta etapa ocorre a lise da parede celular. Centrifugar rapidamente (>1minuto) e acrescentar 250 µL de Acetato de amônia (Solução **3**). Homogeneizar suavemente (verter 10X) e incubar por 10 minutos em gelo. Centrifugar rapidamente (>1minuto) e acrescentar 500 µL de clorofórmio isoamílico (24:1), para a separação das fases orgânica (sedimento que contém os restos celulares e protéicos) e aquosa (sobrenadante que contém os ácidos nucleicos) da solução. Homogeneizar a solução primeiro vertendo suavemente e depois vigorosamente até que as fases formadas estejam misturadas. Centrifugar por 30 minutos a 13.200 rpm. Em um eppendorf de 1,5 mL limpo colocar o sobrenadante (em torno de 700 µL) e acrescentar 400 µL de isopropanol 100% gelado (-20°C) homogeneizar suavemente. Centrifugar por 30 minutos a 13.200 rpm. Nesta etapa ocorre a precipitação do DNA. Retirar o sobrenadante centrifugar rapidamente (>1minuto) e retirar novamente o sobrenadante novamente. Lavar o DNA sedimentado com 300 µL de etanol 70% e centrifugar imediatamente por 1 minuto a 13.200 rpm. Deixar o DNA secar na temperatura ambiente até que o material sedimentado se torne transparente. Re-hidratar por 12 horas a 4°C com 100µL de TE 1X pH8,0.

Depois que o DNA entrar em solução tratá-lo com 25 µL de solução RNase (250µg/ml em TE 1X) afim de degradar o RNA presente. Após esta etapa o DNA foi mantido congelado (-20°C).

Para checar a eficiência da extração, 2µL de DNA foi misturado com 1 µL de Gel Red (diluído 500X em água Mili-Q; Invitrogen) e 2 µL de Loading Dye (5X; Promega). Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 1% em TBE 1X (Solução 4) sendo submetida à eletroforese a 80V por 60 minutos. Os géis foram fotografadas com o programa Kodak sob luz UV no qual visulaizamos as bandas de DNA.

Para a identificação de *V. shiloi*, foi selecionado o gene *pyrH* (Uridilato quinase), discriminatório para espécies de *Vibrio* (THOMPSON *et al.*, 2005). Para aqueles isolados vibrios putativos (recuperados do TCBS, Moreira *et al.*, 2013) e para os quais a amplificação do gene *pyrH* não foi observada com os iniciadores preferenciais (não degenerados e descritos no item 3.1.2 ), a identificação foi realizada com o sequenciamento do gene ribossomal 16S (RNAr 16S). Havendo a confirmação de que pertenciam ao grupo *V. shiloi*/*V. mediterranei*, a amplificação do gene *pyrH*, foi obtida tentativamente pelo emprego de combinações de diferentes iniciadores e pelo ajuste da temperatura de anelamento da PCR, conforme a descrição a seguir.

#### 3.1.4 Amplificação do gene Uridilato quinase (*pyrH*).

Os iniciadores preferenciais (não degenerados) para a amplificação do gene *pyrH* são: 80F (direto) (5'- GATCGTATGGCTCAAGAA G-3') e 530R (reverso) (5'-TAGGCATTTTGTGGTCACG-3') (Tabela 2). Porém apesar de seguir o protocolo usado em diversos trabalhos (CHIMETTO *et al.*, 2008, CHIMETTO *et al.*, 2009, ALVES JR *et al.*, 2010), não se obteve o sucesso na amplificação do gene *pyrH* para um determinado grupo de isolados. Após obtenção da confirmação de que pertenciam ao grupo *V. shiloi*/*V. mediterranei* a partir do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S, a amplificação do gene *pyrH* foi obtida pelo uso de combinações dos iniciadores: 80F (direto) 4F (direto) (3'- ATGASNACBAAYCCWAAACC- 5'), 2R (reverso) (5'-GTRAABGCNGMYARRTCCA- 3'), 5R (reverso) (5'-AKYGTRCCTTCWKCTTCRCC- 3') e 530R (reverso). Todos os iniciadores citados apresentam o mesmo programa para a amplificação do gene *pyrH*. Dentre as combinações testadas, aquela que resultou em melhor resultado foi o par 4F / 530R. Porém, a banda visualizada em gel de agarose para a maioria das linhagens era muito

fraca, isto é, a amplificação foi possível mas com rendimento baixo. Assim foi necessário empregar PCR gradiente, testando cinco temperaturas de anelamento (entre 51 °C e 55 °C). Esta reação foi realizada no termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf). Os iniciadores 4F, 2R e 5R são degenerados, por isso ao se reduzir muito a temperatura de anelamento, aumenta-se a possibilidade de amplificar uma maior quantidade de fragmentos de DNA inespecíficos. Foi verificado que a melhor temperatura de anelamento para a utilização desses iniciadores (4F/530R) é de 54 °C. Nesta temperatura a concentração de produto foi maior e a amplificação de fragmentos inespecíficos foi menor. No entanto, em alguns casos a concentração de DNA dos amplicons ainda era insuficiente para a realização do sequenciamento desse gene (aproximadamente 60 ng de DNA por reação de sequenciamento, observado empiricamente). Desta forma foi necessário aumentar o volume da PCR (50 µL) com posterior concentração dos produtos utilizando o aparelho Speedvac (Eppendorf).

### 3.1.5 Amplificação do gene RNAr 16S

Os iniciadores usados para a amplificação do gene ribossomal 16S (RNAr 16S) foram: 27F (direto) cuja sequência de nucleotídeos é 5'- AGAGTTGATCMTGGCTCAG- 3' e 1492R (reverso) cuja sequência de nucleotídeos é 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3' (**Error! Reference source not found.**). Para cada reação da polimerase em cadeia (PCR) com volume final de 25 µL foram utilizadas: 1 µL de DNA extraído; 15,875 µL de água Mili-Q estéril; 0,5 µL de dNTPs (10 µM); 5 µL de tampão PCR Green Buffer (1X); 1,25 de cada nucleotídeo (10 µM) desejado (direto e reverso) e 0.125 µL de GoTaq. O controle negativo foi feito com água Mili-Q estéril no lugar do DNA a fim de validar o experimento. A PCR foi realizada no aparelho Mastercycler Gradient Applied & Biosystem seguindo o programa: denaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 3 ciclos de 95 °C por 1 min, anelamento 55 °C por 2:15 min e 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 95 °C por 0:30 seg, 55 °C por 1:15 minutos e 72°C por 1:15 minutos para alongamento e extensão seguido de um ciclo de 72 °C por 7 min para extensão final. As bandas geradas pela amplificação do amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% (Tris-Borato- EDTA, TBE 1X), onde foram carregados 2 µL do produto de cada reação de PCR juntamente com 1 µL de Gel Red (1/500). Foi utilizado o padrão de corrida Low Mass (Invitrogen) afim de quantificar a concentração de

produto em cada banda visualizada no gel de agarose. As corridas foram realizadas com 80 V, por 45 minutos. O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o programa Kodak para visualizar e quantificar a concentração em cada banda visível. Em alguns casos que a concentração de amplicon foi muito baixa foi realizado uma reação de cadeia polimerase de 50  $\mu$ L que foi posteriormente concentrada no aparelho SpeedVac (Eppendorf) para um volume entre 5 e 10  $\mu$ L afim de atingirem a concentração necessária para o sequenciamento.

**Tabela 1: Iniciadores utilizados para as etapa das Reações da Cadeia Polimerase para os genes 16 rRNA e *PyrH* e para o sequenciamento destes mesmos genes.**

Iniciadores	Gene	Sequencias (5'-3')	Referência
80F	pyrH	GATCGTATGGCTCAAGAAG	(Thompson <i>et al.</i> , 2007)
4F		ATGASNACBAAAYCCWAAACC	(Thompson <i>et al.</i> , 2005)
2R		GTRAABGCNGMYARRTCCA	(Thompson <i>et al.</i> , 2005)
5R		AKYGTRCCTTCWKCTTCRCC	***
530R		TAGGCATTTTGTGGTCACG	(Thompson <i>et al.</i> , 2007)
27F	RNAr 16S	AGAGTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991 apud (Bourne and Munn, 2005)
1492R		TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991 apud (Bourne and Munn, 2005)
536F		CAGCAGCCGCGGTAATAC	(Thompson <i>et al.</i> , 2001)
1092R		GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	(Thompson <i>et al.</i> , 2001)

### 3.1.6 Purificação dos amplicons obtidos para os genes RNAr e *pyrH*

Os produtos das amplificações por PCR que foram positivos e com quantidade e tamanho desejáveis (aproximadamente 1500 nt para RNAr 16S e 750 nt para *pyrH*) foram purificados utilizando a enzima EXOSAP-IT (Affymetrix). Na reação de purificação de fragmentos de DNA entre 100 nt e 20 knt para cada 5  $\mu$ L do produto da amplificação gerado em cada PCR foi acrescentado 1  $\mu$ L da enzima EXOSAP-IT. Essa mistura é levada ao termociclador Mastercycler Gradient Applied & Biosystem no qual ocorre uma incubação de 37 °C por 30 minutos seguida de outra incubação de 80 °C por 15 minutos. A quantidade de produto da PCR utilizada depende diretamente da concentração de cada amplicon. Para o sequenciamento do gene RNAr 16S é necessário aproximadamente 80 ng de produto de amplificação por PCR, e para o sequenciamento do gene *pyrH*, aproximadamente 60 ng.

### 3.1.7 Sequenciamento gênico

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços, com o kit BigDye Terminator Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems). Cada reação foi feita com 6.3 µl do produto do PCR, 1.2 µl de oligonucleotídeo (concentração inicial 2.7 pmol/µl), 1.5 µl de tampão (Big Dye Terminator Buffer). Todas as reações foram montadas a 4°C sob abrigo da luz devido a fotossensibilidade do Big Dye. O controle dessa reação é feito com 2 µl do gene 3Zf+, 1µl do primer M12 ambos fornecidos pelo fabricante, 4.5µl de água Mili-Q, 1.5 µl do tampão e 1 µl de Big Dye. Os primers utilizados para o sequenciamento do gene 16S rRNA foram 536F (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') e 1092R (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3') (THOMPSON *et al.*, 2001), que sequenciam o terço central do gene. Para o sequenciamento do gene Uriditado quinase foram utilizados os primers 530R (inverso); 80F e 4F (direto) . A reação foi incubada no termociclador Mastercycler Gradient Applied & Biosystem com o seguinte programa: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação iniciamos a etapa de precipitação acrescentando 80 µl de isopropanol 75% e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação a placa foi centrifugada por 45 minutos com a velocidade de 4000 rpm a temperatura de 21°C. Seguindo a centrifugação a placa foi vertida cuidadosamente em um papel toalha e centrifugada sobre este mesmo papel por 1 minuto com a velocidade de 900 rpm. A placa foi secada em um termociclador por 5 minutos a temperatura de 75 °C aberta. Podemos parar nesta etapa e manter a placa congelada por no máximo 1 mês na temperatura de -20 °C. Caso não congelamos, continuamos a extração adicionando 10 µl de formamida e posteriormente centrifugamos por 1 minuto a 900 rpm a 21°C. Em seguida a placa foi incubada por 5 minutos a 95°C sendo colocada imediatamente após esta incubação no freezer (-20 °C) por 2 minutos, afim de dar um choque térmico estabilizando assim a resuspensão dos produtos na formamida. Após o choque térmico a placa foi colocada imediatamente no sequenciador Applied Biosystem 3500.

### 3.1.8 Edição e análise de sequências

Após o sequenciamento, as sequências foram analisadas quanto a confiabilidade das bases obtidas no programa Sequencing Analysis (Applied Biosystem). Estas sequências foram então carregadas no programa ChromasPro v1.5 ( Technelysion Pyt LTDA) no qual os picos do eletroferograma foram visualizados e validados assim como as porções iniciais e finais foram cortadas por serem geralmente ruidosas. As sequências consenso foram obtidas pela sobreposição da sequência direta com a sequência reversa, possibilitando assim a correção das bases que apresentavam imprecisão. Após esta edição, as sequências foram exportadas sob formato FASTA e submetidas ao programa on-line “Basic Local Alignment Search Tools”- BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), onde foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados público mundial GenBank (GENBANK, 2012). Após a comparação os resultados mais similares aos organismos em estudo guiaram a escolha das espécies tipo mais próximas, cujos nomes, foram obtidos com base na lista de nomes de espécies validados, publicada em “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”- LPSN (EUZEBY, 2013). As sequências tipo mais similares com as sequências estudadas foram obtidas do “National Center for Biotechnology Information”- NCBI (NCBI, 2013) e estas foram usadas para a construção de árvores filogenéticas, para posterior identificação dos isolados bacterianos em estudo.

### 3.1.9 Alinhamento das sequências e construção das árvores filogenéticas

As sequências geradas no estudo juntamente com as sequências das linhagens tipo foram organizadas em um único arquivo do tipo FASTA (multi-fasta) e importadas para o programa MEGA v5, onde foram alinhadas pelo programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994). O alinhamento foi analisado visualmente a fim de checar possíveis erros no sequenciamento, edição e orientação das sequências. Com o auxílio do programa MEGA foram construídas as árvores filogenéticas com base no método de distância gênica Neighbour- Joining e modelo de distância gênica “Tamura- Nei” (SAITOU and NEI, 1987). A robustez de cada topologia obtida foi corroborada pela adição de réplicas de Bootstrap (1000) (FELSENSTEIN, 1985). No alinhamento utilizado para a construção das árvores filonegéticas utilizado o gene RNAr 16S as sequências incluíam 983 pb e para o gene *pyrH*, 501 pb.

### 3.2 Análise da estrutura populacional e evolução ecológica do grupo *V. shiloi*

Para analisar a estrutura populacional dentro da espécie *V. shiloi* foram utilizadas as sequências parciais geradas para o gene *pyrH*, aplicando inicialmente o programa DnaSP 5.1 (DNA Sequence Polymorphism) (LIBRADO, 2009). O “software” DNAsp foi empregado para avaliar a diversidade e divergência de haplótipos dentro desta população e agrupá-los de acordo com a similaridade da composição de nucleotídeos. A partir do arquivo gerado pelo Dnasp foi calculada e construída a rede de haplótipos, utilizando o programa Network 4.6.1.1 (POLZIN, 2004). Este programa contabiliza as mutações de nucleotídeos ocorridas e calcula as distâncias entre cada haplótipo, assim como sua frequência e em quais nucleotídeos as mutações foram identificadas.

Afim de estabelecer uma evolução ecológica revelando populações específicas entre as linhagens de *V. shiloi* estudadas, foram analisados padrões gênicos entre *V. shiloi*/ *V. mediterranei* de vida livre (água do mar, sedimento e plâncton) e associados a diferentes holobiontes (coral: *M. decactis*, *Mussismilia hispida* e *O. patagonica*; bivalve: *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis*, *Ruditappes philippinarum*, *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis*, *Donax sp.*; poliqueta: *H. carunculata*, e Peixe: *Sphoeroides anulatus*, *Lutjanus guttatus* e *Sparus aurata* e salmão) foi utilizado o software ADAPTML (HUNT *et al.*, 2008). Este software constrói uma cadeia de Markov escondida usando as variáveis ambientais dadas e a filogenia baseada nas sequências usadas descrevendo assim a evolução das associações com os habitats. A probabilidade de nodos próximos na filogenia dividirem o mesmo habitat é função do comprimento do ramo separando estes nós e de um parâmetro que representa a taxa que determinada linhagem pode transitar entre diferentes habitats. As variáveis observadas (a categoria ambiental de cada linhagem amostrada) são representadas nas folhas da filogenia. O algoritmo utilizado pelo programa é capaz de inferir habitats para cada nodo de acordo com os dados inseridos no programa e a taxa de transição entre habitats, que inicialmente é  $10^{-1}$  (transições por substituição/ sítio que é relativo ao comprimento dos ramos na filogenia). Uma vez designados os habitats, o programa calcula a probabilidade de todas as linhagens que compartilham o

mesmo habitat constituírem uma mesma população. Somente os grupos formados com alta confiança ( $p < 0.0001$ ) são considerados populações ecológicas (HUNT *et al.*, 2008).

O software ADAPTML constrói um modelo evolutivo para identificar populações como grupos de linhagens relacionadas dividindo um mesmo habitat projetado. Este habitat reflete a abundância relativa medida na categoria ambiental escolhida, que no nosso caso é delimitada pela fonte de isolamento de cada linhagem. Na prática a entrada do modelo é uma filogenia e a característica ambiental de cada linhagem. Por fim mudanças na preferências ambientais são mapeadas na árvore filogenética para cada linhagem existente e ancestral na filogenia. Apesar de semelhante aos métodos de parcimônia, verossimilhanças e bayesianos que mapeam ancestrais filogenéticos nas árvores, o modelo usado pelo ADAPTML leva em conta a complexidade e as incertezas nas amostragens (HUNT *et al.*, 2008). Devido à diversidade de fontes de isolamento tentamos identificar preferências de microhabitats, já que os recursos disponíveis assim como os fatores estressantes variam de acordo com o estilo de vida que determinada linhagem possui, o que conseqüentemente poderia refletir na formação de ecótipos distintos.

Para as análises geradas pelo ADAPTML foram utilizadas sequências do gene *pyrH* de linhagens de *V. mediterranei*/ *V. shiloi*, retiradas do banco de dados NCBI (NCBI, 2013). O habitat destas linhagens, que eram associadas a diferentes hospedeiros e/ou de vida livre juntamente com os haplótipos encontrados na análise de estrutura populacional de *V. shiloi*/ *V. mediterranei*, foram relacionados como informações de entrada. A linhagem de *Aliivibrio salmonicida* foi utilizada como grupo externo. A tabela a seguir informa as sequências do gene *pyrH* utilizadas para gerar o modelo de evolução ecológica para este grupo:

**Tabela 2 - Sequências do gene *pyrH* retiradas do banco de dados mundial GenBank com a respectiva fonte de isolamento, seu número de acesso e sigla ecológica utilizada para identificá-lo, de modo a gerar o modelo de evolução ecológica pelo software ADAPTML.**

Linhagem	Fonte de Isolamento	Sigla/ Ecologia	Número de acesso
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1211	Bivalve/ <i>Crassostrea corteztensis</i>	BC	HF545969.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1178	Bivalve/ <i>Crassostrea corteztensis</i>	BC	HF545968.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain665	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545957.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain658	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545956.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain424	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545955.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain343	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545954.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain354	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545941.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain342	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545940.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain333	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545938.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain328	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545937.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain322	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545936.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain261	Bivalve/ <i>Mytilus edulis</i>	BE	HF545932.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT 7871	Bivalve/ <i>Ruditappes philippinarum</i>	BR	HF545973.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-7872	Bivalve/ <i>Ruditappes philippinarum</i>	BR	HF545973.1
<i>Vibrio mediterranei</i> XOM3	Bivalve/ <i>Ostraea edulis</i>	BT	HF545946.1
<i>Vibrio mediterranei</i> 8OM16	Bivalve/ <i>Ostraea edulis</i>	BT	HF545945.1
<i>Vibrio mediterranei</i> 2OT7	Bivalve/ <i>Ostraea edulis</i>	BT	HF545944.1
<i>Vibrio mediterranei</i> 11OT14	Bivalve/ <i>Ostraea edulis</i>	BT	HF545943.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain224	Bivalve/ <i>Donax sp.</i>	BX	HF545951.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain217	Bivalve/ <i>Donax sp.</i>	BX	HF545950.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1601	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545971.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1118	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545967.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1056	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545966.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1055	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545965.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1035	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545964.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-944	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	BZ	HF545963.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-638	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716861.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-639	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716862.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-660	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716875.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-661	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716876.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-685	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716898.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-686	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716899.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-720	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716925.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-713	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CM	EU716920.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-7873	Bivalve/ <i>Crassostrea gigas</i>	CO	HF545975.1
<i>Vibrio shiloi</i> LMG 19703 ( H-1)	Coral/ <i>Oculina patagonica</i>	CO	JN039147.1
<i>Vibrio maritimus</i> R-40493	Coral/ <i>Palythoa</i>	CP	GU929933.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-18	Coral/ <i>Palythoa</i>	CP	EU716811.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-1246	Peixe/ <i>Lutjanus guttatus</i>	FG	HF545970.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CAIM-831	Peixe/ <i>Sphaeroides anulatus</i>	FN	HF545962.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT 7870	Peixe/ <i>Sparus aurata</i>	FU	HF545972.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-622	Água do Mar	MA	HF545930.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-14990	Água do Mar	MA	AJ842649.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-17	Água do Mar	MA	HF545961.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-150-13	Água do Mar	MA	HF545960.1
<i>Vibrio mediterranei</i> M8	Água do Mar	MA	HF545959.1
<i>Vibrio mediterranei</i> R-150-31	Água do Mar	MA	HF545958.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain318	Água do Mar	MA	HF545953.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain316	Água do Mar	MA	HF545952.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain205	Água do Mar	MA	HF545949.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain203	Água do Mar	MA	HF545948.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain200	Água do Mar	MA	HF545947.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain355	Água do Mar	MA	HF545942.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain335	Água do Mar	MA	HF545939.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain306	Água do Mar	MA	HF545935.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain284	Água do Mar	MA	HF545934.1
<i>Vibrio mediterranei</i> strain263	Água do Mar	MA	HF545933.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-622	Água do Mar	MA	HF545930.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-623	Água do Mar	MA	HF545929.1
<i>Vibrio mediterranei</i> LMG 11258 ( H-2)	Plâncton marinho	ML	GU266288.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-615	Plâncton marinho	ML	HF545931.1
<i>Vibrio mediterranei</i> CECT-621	Sedimento Marinho	MS	HF545928.1
<i>Allivibrio salmonicida</i>	Peixe/ Salmão	FJ	EU118245.1

### 3.3 Taxonomia de potencial espécie nova

#### 3.3.1 $\Delta T_m$ pelo método fluorimétrico em plataforma RT PCR.

Para as linhagens de *V. shiloi* que apresentaram menos de 94% de similaridade na sequência parcial do gene *pyrH* em comparação com a linhagem tipo (AK1<sup>T</sup>) (THOMPSON *et al.*, 2005), foi determinado o  $\Delta T_m$ . A extração de DNA dessas linhagens foi realizada com base no protocolo de extração de Willems e colaboradores (WILLEMS *et al.*, 2001), que tem como resultado um DNA de alta pureza e concentração, requeridas para a realização desta técnica. Este processo consiste três etapas realizadas em três dias seguidos.

##### 3.3.1.1 Extração de alta qualidade em larga escala

A extração se inicia com o recolhimento de 1g de célula com auxílio de uma alça bacteriológica estéril em tubos de polipropileno de 50mL (Nalgene). Estas células foram crescidas até dois dias antes do início da extração em placas de Petri grande (150 X 21 mm) de meio TSA 2,5% de NaCl (trypticase soy agar- Difco). Já no tubo as bactérias foram lavadas com 5 mL de tampão de ressuspensão com NaCl 3%. O sal acrescentado mantém o meio isotônico para as bactérias marinhas, impedindo que as células se rompam durante o processo. As células foram centrifugadas 15 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o material sedimentado foi ressuspensionado com 3,75mL de tampão Tris-EDTA ( Solução 5) e 200 $\mu$ L de RNase (10mg/ml). A solução formada foi homogeneizada suavemente por inversão. Adicionou-se em seguida 1mL de solução SDS 10% e homogeneizou-se novamente, posteriormente acrescentou-se 50 $\mu$ L de proteinase K (20mg/mL) seguida de uma suave homogeneização. Esta mistura foi incubada à 65°C por 1 hora. Nesta etapa a solução ficará incolor e viscosa devido a quebra da parede celular.

Após a incubação adicionou-se 1,5mL de solução NaCl 5M, homogeneizou-se gentilmente a solução e acrescentou-se 1mL CTAB/NaCl (Brometo de Cetil Trimetil Amônio)/NaCl diluído 7,5X e novamente homogeneizou-se manualmente por inversão. A solução foi incubada por 20 minutos à 65°C. Nesta etapa o envelope celular, proteínas desnaturadas e os polissacarídeos formam um complexo com o CTAB enquanto os ácidos nucléicos permanecem em solução. Em seguida iniciou-se a primeira extração orgânica usando 5ml de clorofórmio-

isoamílico (24:1, v/v); A solução foi homogeneizada inicialmente suavemente por inversão até se tornasse homogênea e em seguida misturada vigorosamente até a formação de uma emulsão. A solução homogeneizada foi centrifugada por 30 minutos a 11.000 rpm em temperatura de 20°C. Esta primeira extração remove os complexo formado pelo CTAB com as proteínas e polissacarídeos. Após a centrifugação é possível visualizar uma interfase esbranquiçada entre a fase inferior (clorofórmio) e superior (tampão e DNA). A fase superior (aproximadamente 7mL) foi coletada rapidamente com o auxílio de uma ponteira estéril com a ponta cortada, afim de evitar a quebra do material genético, para um Becker de vidro de 50ml. Nesta etapa deve-se tomar cuidado para não pipetar a interfase esbranquiçada afim de garantir um DNA mais limpo. Foram adicionados então 4,2 ml (0,6 volumes) de isopropanol 100% gelado (-20°C) o que tornou o DNA visível, como se fosse uma nuvem esbranquiçada. O DNA então foi enrolado com um bastão de vidro, com movimentos circulares, suaves e constantes até que observássemos uma mudança na coloração da solução, passasse de esbranquiçada para translúcida indicando que todo o DNA estava enrolado no bastão. Uma vez o DNA enrolado, este foi lavado, mergulhando-o sucessivamente em soluções de etanol de 70%, 80% e 90%, para uma total remoção do CTAB restante. O DNA secou na temperatura ambiente por cerca de 15 a 20 minutos, até que o cheiro do etanol tivesse desaparecido. Em seguida o DNA foi mergulhado em 5ml de TE 1X pH8,0 até que ele se reidratasse e soltasse do bastão. Após 30 minutos o bastão foi retirado da solução suavemente até que a tensão superficial do tampão puxasse o DNA para baixo. O DNA foi colocado a uma temperatura de 4°C por aproximadamente 16 horas para a sua total solubilização.

No segundo dia, a solução de DNA com TE 1X foi transferida para outro tubo de polipropileno de 50 mL no qual foi adicionado posteriormente 1,5 mL de NaCl 5M, posteriormente foi feita uma suave homogeneização, adicionado em seguida 1 mL de CTAB/NaCl. Após outra inversão manual a mistura foi incubada por 20 minutos a 65°C. Seguindo a incubação foi adicionado 5mL de clorofórmio-isoamílico (24:1, v/v) e homogeneizado suavemente. A solução obtida foi centrifugada por 30 minutos a 11000 rpm a 20°C. O sobrenadante (aproximadamente 7 mL) foi transferido para um Becker de 50 ml no qual foi adicionado 4,2mL de isopropanol 100% gelado. Novamente o DNA foi recuperado usando um

bastão de vidro, lavado nas soluções de etanol, secado a temperatura ambiente e dissolvido novamente em TE 1X no qual foi deixado descansar seguindo os passos descritos na etapa de recuperação do DNA do primeiro dia.

No terceiro e último dia, DNA dissolvido em TE 1X foi novamente transferido para um tubo de prolipropieno onde foram adicionado 50µL de RNase (10mg/ml), sendo 10µL para cada 1 mL de tampão em solução. A solução foi homogeneizada manualmente e incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação acrescentou-se 560µL de acetato-EDTA pH 7,0 (112µL para cada 1 mL de solução) e homogeneizou-se suavemente por inversão. A solução então recebeu 305µL de clorofórmio- álcool isoamílico (24:1, v/v) (700µL para cada 1mL de tampão) misturou-se suavemente por inversão. Seguidamente a solução foi centrifugada por 20 minutos a 14000 rpm a 20°C. O sobrenadante (entre 1 mL e 3 mL) foi transferido para um novo Becker de 50 mL no qual foi adicionado 2 mL de isoporpanol 100% gelado para cada 1 mL de sobrenadante recuperado. O DNA foi novamente enrolado em um bastão de vidro, lavado em soluções de etanol, secado ao ar livre e dissolvido em 500 µL de tampão SSC 1X e pH 8,0 seguindo os passos descritos na etapa de recuperação do DNA do primeiro dia. O DNA foi solubilizado por 24 horas a 4° C.

A qualidade da extração do DNA foi verificada utilizando o equipamento Nanodrop 3000, que nós dá como resultado a concentração e a pureza do produto obtido da extração. A concentração de DNA ideal é entre 400 e 600 ng por µL de tampão SSC 0.1X. A pureza do DNA deve resultar em razões 260/280 (ácido nucléico/ proteínas) entre 1.8 e 2.0 e a razão 260/230 (ácido nucleico/ compostos aromáticos, polissacarídeos, restos da extração de DNA) acima de 1.8. Dependendo da concentração obtida foi preciso diluir o DNA serialmente, sendo que, de uma diluição para outra era necessário esperar por 24 horas a 4°C para a total solubilização do DNA. Tais cuidados aumentam a chance de que as medidas de concentração do DNA sejam acuradas, e por consequência, que a confecção da solução equimolar de DNAs (para a formação do híbrido) seja eficaz.

### **3.3.1.2 Experimentos para a determinação da %GC e $\Delta T_m$ em plataforma RT PCR**

Os experimentos foram realizados no aparelho de RT PCR ABI 7500 (Applied Biosystems) com o auxílio do programa gerenciador do equipamento (7500 Software v.2.0.1 – Applied

Biosystems). O protocolo seguido foi de acordo com o descrito em Moreira e colaboradores (MOREIRA *et al.*, 2011). Durante todo o processo, usaram-se luvas sem talco e um suporte vazado para a placa ótica de 96 poços, para impedir que qualquer sujeira pudesse se acumular sobre o adesivo ótico ou embaixo da placa. Qualquer manipulação sobre o adesivo ou abaixo da placa pode deixar marcas que podem ser lidas pelo sensor ótico do RT PCR, uma vez que este lê a fluorescência através da luz que atravessa o poço, causando assim anomalias nas análises.

Para a determinação do conteúdo de GC (%mol G+C) das linhagens candidatas à espécie nova e das linhagens tipos de referência, foi utilizada uma placa de 96 poços ABI Prism Optical Reaction Plates (Applied Biosystems), na qual foram carregados 2 µg de DNA em tampão SSC 0,1 X, adicionado de SYBR a 1:100.000 X, em um volume final de 25 µL. A adição do SYBR foi feita ao abrigo da luz. Cada amostra foi carregada em quadruplicata, adicionando-se também o controle negativo, sem DNA. A placa foi cuidadosamente selada com o adesivo MicroAmp Optical Adhesive Fil (Applied Biosystems) sendo inserida no aparelho de RT PCR. Em seguida, foi realizada a rampa de desnaturação térmica, com a cadência de 0,2 °C/s, com medida de fluorescência a cada 12 s, durante toda a rampa de desnaturação (de 25 °C até 99,8 °C). A  $T_m$  de cada amostra foi calculada pela média das  $T_{ms}$  obtidas das réplicas, sendo este valor inserido na curva padrão [%GC = (1,5617 x  $T_m$ ) - 77,841] (MOREIRA *et al.*, 2011) obtendo-se assim o valor de % GC do genoma em questão. O experimento de %GC foi reproduzido por três vezes.

Para o experimento de Delta  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ), foram utilizadas as mesmas placas e adesivos citados no experimento de %GC. O DNA das linhagens candidatas a espécie nova (DNA a) e os DNA das linhagens tipo (DNA b) de referência, mais próximas filogeneticamente a estas, foram hibridizados na seguinte combinação: DNA a x DNA a (homólogo A), DNA a x DNA b (híbrido), DNA b x DNA b (homólogo B). Cada combinação foi carregada, em quadruplicata, na placa ótica de 96 poços, onde cada poço continha 5 µg de DNA em 22,5 µL de volume ao todo. A placa então foi incubada em termociclador à temperatura de 99 °C, por 10 min, para a desnaturação das duplas fitas. Após, seguiu-se a incubação por 8 horas, à temperatura ótima de renaturação, que é em função do a %GC ( $T_{or}=0.51\%GC+47.0$ ) (LEY *et al.*, 1970). Em seguida foi realizado o esfriamento gradual, 10 °C a cada hora, até atingir-se a temperatura de 25 °C. Após o esfriamento a placa foi mantida a 4 °C até o uso das amostras. O longo tempo de incubação à

temperatura ótima de renaturação e o resfriamento vagaroso tem por objetivo a estabilização dos híbridos formados. Após a formação dos híbridos, o SYBR foi adicionado (1:100.000), ao abrigo da luz, o que elevou o volume final de cada poço para 25  $\mu$ L. Após ser coberta novamente com um adesivo ótico, a placa foi inserida no RT PCR, para a leitura das  $T_{ms}$  das amostras. A rampa de desnaturação foi a mesma utilizada para o experimento de % de GC, gerando assim 375 medidas de fluorescência por poço. Após a corrida, os dados foram exportados do aparelho, com o auxílio do programa gerenciador, no formato de uma tabela de Excel™. Para cada poço, a leitura de fluorescência máxima era identificada, sendo esta o valor de 100% em relação às demais medidas. A temperatura que correspondia à 50% da fluorescência a  $T_m$  de todas as réplicas, foi usada para o cálculo da média aritmética por amostra. Desta forma, foi calculada a  $T_m$  dos homólogos (a e b) e a do híbrido (ab), cuja diferença (ab – a ; ab – b) corresponde aos valores de  $\Delta T_m$ . Os experimentos de  $\Delta T_m$  foram repetidos duas vezes. A medida de erro usada foi o Erro Padrão.

### **3.4 Patogenicidade de isolados do grupo *Vibrio shiloi***

#### **3.4.1 Teste de patogenicidade com artêmias**

Isolados representativos dos grupos observados na filogenia gerada com base no gene *pyrH* foram selecionados para testes de patogenicidade. O organismo modelo utilizado para os ensaios foi o microcrustáceo artêmia (*Artemia sp.*). Este teste é realizado em três etapas: crescimentos das linhagens bacterianas a serem testadas e desencapsulação das artêmias; preparo das placas experimentais e inoculação das linhagens e por último, cálculo da taxa de sobreviventes. O processo tem a duração de três dias, sendo cada etapa citada acima feita em um dia.

No primeiro dia o processo de desencapsulação inicia-se com a coleta de aproximadamente 1 mL de cistos de artêmias em um tubo falcon de 50 mL, seguida de incubação destes em 20 mL de água do mar artificial autoclavada (Red Sea Salt) por uma hora, em temperatura ambiente com agitação e iluminação constante. Após esta incubação, os cistos foram deixados sedimentar naturalmente, sendo a água retirada quase por completo, com cuidado para evitar a perda de cistos. Estes foram lavados com 15 ml de água sanitária

(hipoclorito de sódio) por no máximo 5 minutos, sob agitação manual constante, até ocorrer uma mudança em sua coloração, passando de marrons para alaranjados. Os cistos foram deixados sedimentar naturalmente e a água sanitária foi retirada inicialmente por inversão e, posteriormente, com uma pipeta para evitar a perda de cistos que ocorre em grande quantidade nesta etapa. Em seguida os cistos foram lavados com água do mar autoclava estéril por 10 vezes. Entre uma lavagem e outra era importante esperar os cistos sedimentarem afim de evitar a perda destes, já que entre as lavagens a água é retirada por inversão. Todo o procedimento descrito foi realizado em um fluxo laminar estéril. Após as lavagens os cistos são incubados por 36 horas em um tubo falcon de 50 mL com 25 mL de água no mar autoclava sob agitação, aeração e iluminação constante, a temperatura ambiente afim de que ocorra a eclosão das artêmias.

Neste mesmo dia foi feito o pré inóculo das linhagens bacterianas a serem testadas. Estas linhagens foram crescidas até dois dias antes do início do experimento em placas de petri pequenas de Ágar Marinho (AM -Difco) ou TSA 2,5 % a partir de um estoque puro (-80°C). Destas placas foram coletadas uma única colônia de cada linhagem, que posteriormente foi colocada em tubo falcons de 15 mL que continham 5 mL de caldo Marine (CM, Difco) e incubada por aproximadamente 12 horas sob temperatura de 30°C com agitação constante.

No segundo dia o pré-inóculo foi diluído 100X em caldo marinho, fazendo assim o inóculo a ser utilizado no processo de patogenicidade, sendo este incubado a 30°C, sob agitação constante até atingir a OD 1.3. Nesta OD as linhagens estavam com a concentração ideal para a realização dos testes ( $1 \times 10^9$  UFC/ mL). Para a verificação da concentração de bactérias, foi feita a diluição seriada de uma alíquota deste inóculo, plaqueando as diluições de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  cada vez que o experimento foi realizado. Parte do inóculo foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. As células sedimentadas foram ressuspendidas em água do mar autoclavada na mesma quantidade que foram centrifugadas e posteriormente foram inoculadas no experimento tendo sua concentração final de  $10^{-8}$  UFC/mL. Durante a incubação do inóculo foi feita a montagem do experimento, utilizando uma placa de 24 poços. Parte das artêmias recém eclodidas foram diluídas em um tubo falcon de 50 mL com 20 mL de água do mar autoclavada para facilitar a sua captura e contagem.

Inicialmente estes testes foram feitos utilizando tubos falcon de 50 mL que eram matidos sob aeração e iluminação constantes, nos quais eram colocadas 30 artêmias recém eclodidas em 20 mL de água do mar artificial estéril. Porém a estrutura para realizar esse processo era complexa e havia uma dificuldade muito grande na acurácia do experimento já que era difícil visualizar e contar as artêmias em um volume de água tão grande. Não havia então a certeza do número inicial de artêmias tampouco do número final, sempre existindo uma variação relativamente grande nestes número.

Em vista disso, foi necessário alterar o protocolo. Como alternativa, o ensaio foi feito em placas de 24 poços, sendo que cada poço tinha capacidade máxima para 2,5 mL de água do mar estéril. Devido a esse pequeno volume foi necessário reduzir o número de artêmias por réplica, sendo coladas somente 10 artêmias por poço, que eram capturadas com o auxílio de uma pipeta Eppendorf com capacidade máxima de 200 µL. O volume de água necessário para capturar as 10 artêmias variou de 100 a 600 µL. O volume de cada poço já contendo as artêmias foi completado para 2,25 mL com água do mar autoclavada com exceção do controle, que foi completado para o volume final de 2,5 mL. Nos testes iniciais verificamos que não era necessário aeração constante do experimento mas a iluminação constante continuava sendo necessária. Em cada poço foi inoculada 0.25 mL de solução de água do mar autoclavada com as células das linhagens a serem testadas, atingindo-se o volume final de 2,5mL por poço. Neste dia também foi feita a verificação da concentração em que as linhagens foram inoculadas, se estas tivessem de acordo com a concentração ideal ( $10^{-9}$  UFC/ml e  $10^{-8}$  no caso da linhagem 354) o experimento era validado.

O desenho do experimento está esquematizado na Figura 3 . Em cada linha (A, B, C e D) foi feito um tratamento com uma linhagem diferente e um controle. Quando um conjunto de três poços (1, 2 e 3; 4, 5 e 6), se comportassem da mesma maneira, eram considerados uma única réplica. Dessa forma em cada placa teria-se três tratamentos e um controle, cada um com duas réplicas com 30 artêmias. Este esquema foi repetido de duas a quatro vezes de acordo com a repetição do experimento (Figura 4). Desta forma, com o novo método de realizar o experimento foi possível verificar a quantidade de artêmias por poço com o auxílio de uma lupa aumentando a acurácia dos resultados.

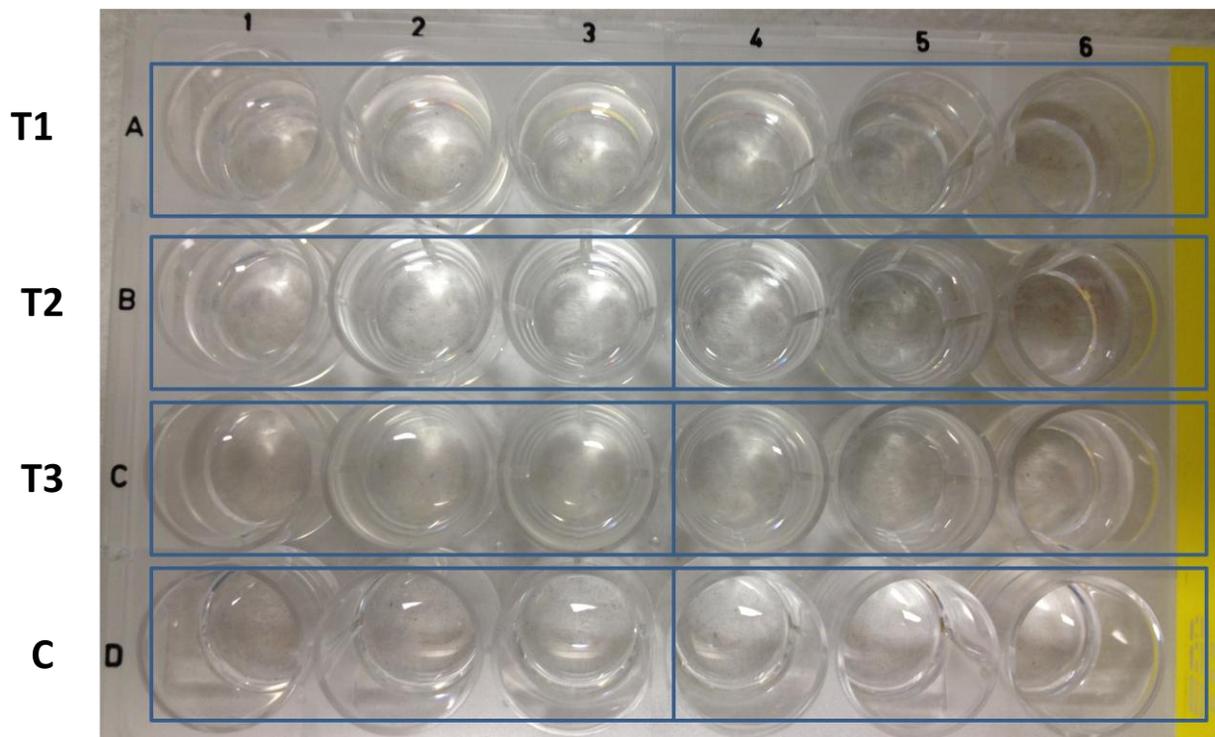


Figura 3 - Esquema de como foram montados e analisados os experimentos em placas de 24 poços.



Figura 4 - Ensaio de patogenicidade com 5 placas, testando 4 linhagens diferentes. Três linhagens com 8 réplicas e 1 linhagem com 6 réplicas. Incubadora com iluminação e temperatura constante de 30°C.

Somento no terceiro e último dia, após 40 horas de incubação a 30°C (Figura 4) , foi verificada a taxa de sobrevivência. Com o auxílio de uma lupa foi contabilizado o número de artêmias mortas no fundo de cada poço e boiando sem nenhuma movimentação. Após esta contagem foi adicionado em cada poço 200 µl de água sanitária afim de matar todas artêmias

restantes e afim de facilitar a contagem uma vez que nos poços em que ocorreu a infecção a água ficava turva. Foi feita uma contagem total do número de artêmias em cada poço e foi descontado o número de artêmias mortas contadas previamente, assim como a média e desvio padrão. Caso as amostras se comportassem de maneira similar, cada três poços eram considerados como uma réplica e o valor da média era considerado o valor final. O experimento para verificar a patogenicidade foi repetido por 4 vezes e os resultados compilados em uma única figura. Foi realizado um Teste t para comparação dos resultados obtidos utilizando as diferentes linhagens.

Também para a realização de experimentos de patogenicidade foi construída uma sala experimental no biotério do Laboratório de Microbiologia - UFRJ. Foram instalados dois aquários com o intuito de permitir bioensaios com organismos que se aproximassem das fontes de isolamento de micro-organismos das diferentes linhas de pesquisa do Laboratório (Algas, corais e esponjas). No caso das linhagens estudadas nesta dissertação, brevemente será possível a realização de experimentos de infecção utilizando corais como organismo modelo.

### **3.4.2 Sala experimental**

A sala experimental (Figura 5) é composta de dois tanques com fotoperíodo de 12h/12h (claro – escuro), lâmpadas HQI simulam a luz do sol e lâmpadas Marine Glo que simulam a luz do entardecer e amanhecer, as luminárias possuem exaustores que retiram o calor produzido pelas luzes de cima dos tanques. A sala fica em temperatura constante de 23 °C. Os tanques possuem aquecedores que permitem manter a água na temperatura desejada. Não só a temperatura como também a luminosidade podem ser monitoradas constantemente com o auxílio de um HOBO data logger. Para os experimentos com corais foram adquiridos beckers de vidro de 2 litros que podem ser posicionados nos tanques de vidro constituindo microcosmos para bioensaios.



**Figura 5 - Sala experimental do Laboratório de Microbiologia elaborada para a realização de bioensaios de infecção com organismos que se aproximem da fonte de isolamento dos micro-organismos.**

A sala experimental vem sendo utilizada para teste-pilotos de ensaio de infecção com corais e a alga *Laurencia sp.* (Rodophyta) realizados pela aluna de doutorado Louisi Oliveira vinculada ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. Neste experimento foi testada a virulência das linhagens *V. shiloi* AK1, *V. coralliilyticus* e *Vibrio alginolyticus* e as linhagens utilizadas neste trabalho A-354, A-203 e A-384 (Moreira et al., 2013) em duas temperaturas diferentes 25°C e 27°C.

### **3.5 Análise de genes ligado a virulência de *V. shiloi* (A-203 e A-354)**

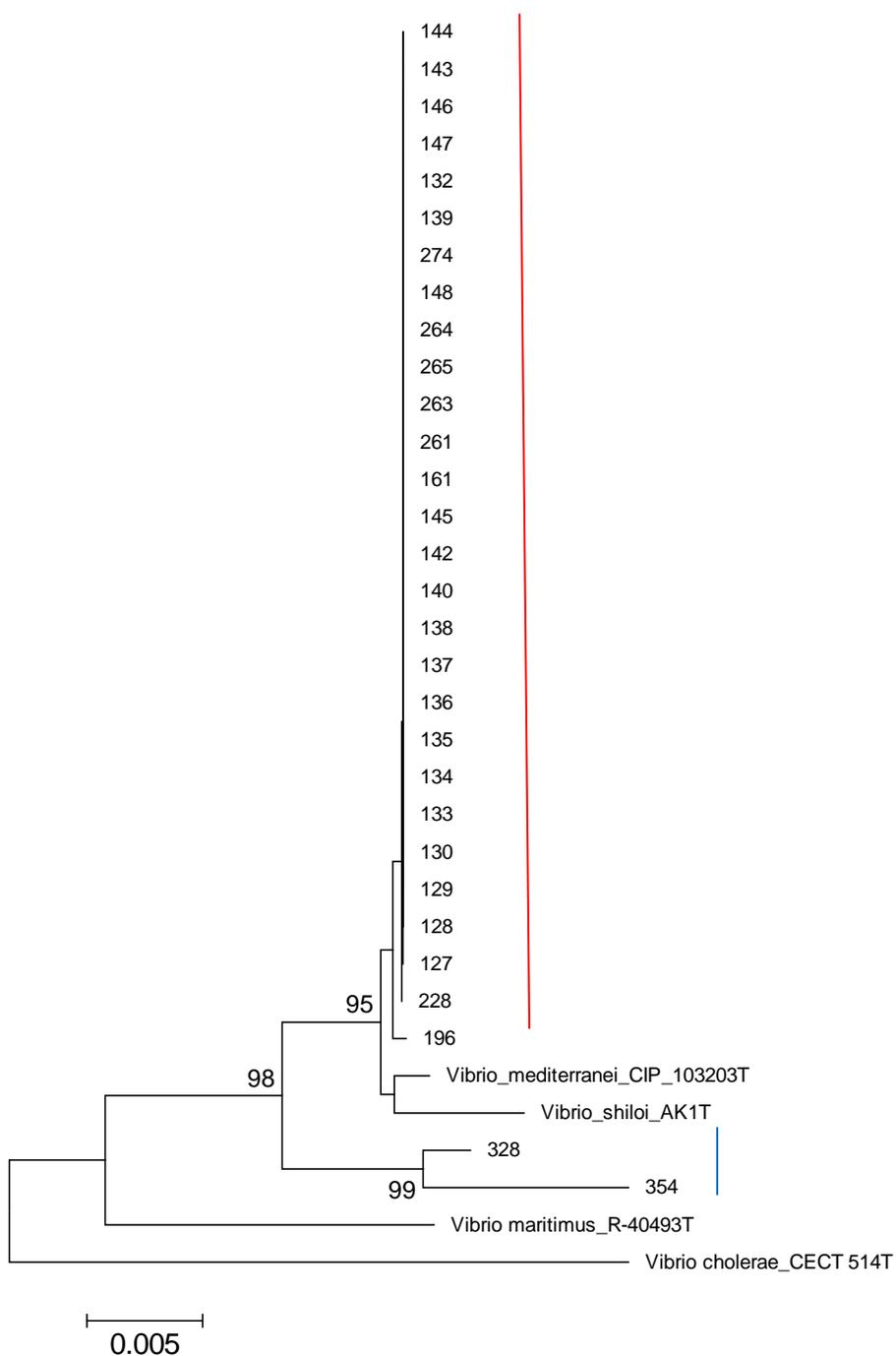
O genoma completo de duas linhagens de *V. shiloi* (A-230 e A-354) descritas neste estudo foi sequenciado e os subsistemas ligados a virulência foram encontrados (Dados não publicados. Sequenciamento e análises preliminares realizadas por: Milene Dias, Luciane Chimetto e Ana Paula Moreira – Unidade Genômica, Laboratório de Microbiologia, UFRJ). As linhagens escolhidas foram as representantes das duas populações formadas por isolados descritos neste estudo. A linhagem A-203 representante da população 4 e a linhagem A-354 representante da população 1.

#### **4. RESULTADOS**

Foi analisado um total de 46 isolados. 43 foram recuperados do poliqueta *H. carunculata* e três de espécimes do coral *M. decactis* saudáveis.

##### **4.1 Análise taxonômica dos isolados de *V.shiloi*.**

Com base na análise da sequência do terço médio do gene RNAr 16S foram encontrados 30 isolados com similaridade entre 98% e 100% com a linhagem tipo de *V. shiloi*/*V. mediterranei*. A figura 6 apresenta a filogenia construída com as sequências do gene RNAr 16S das linhagens estudadas. As três linhagens provenientes do coral formaram um ramo independente, com alto valor de bootstrap (99).



**Figura 6 -** Árvore filogenética construída com sequências do terço médio do gene RNAr 16S (983 pb) pelo método Neighbor-Joining. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). Foram incluídos 28 isolados e quatro linhagens tipo. O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta *H. carunculata* e a linhagem tipo *V. shiloi*. O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral *M. decactis*. A barra representa 0,5% de divergência entre as sequências. *V. cholerae* foi usado como grupo externo.

Com base nas sequências geradas do gene *pyrH*, foi possível a identificação de 46 isolados. A figura 7 apresenta a filogenia construída com as sequências do gene *pyrH* das linhagens estudadas comparando-as com as sequências tipo mais similares. 43 isolados apresentaram similaridades de 98% a 100% com a sequência tipo mais próxima de *V. shiloi*. Os três isolados do coral apresentaram similaridade menor que 94% com a espécie tipo de *V. shiloi*. Essas linhagens, assim como na filogenia com o RNAr 16S, formaram um ramo independente, sustentado por alto bootstrap (100), sugerindo a possibilidade de serem uma espécie nova (THOMPSON *et al.*, 2005, THOMPSON *et al.*, 2009).

A figura 8 apresenta a árvore concatenada construída a partir das sequências do terço médio do gene RNAr 16S e *pyrH*. Podemos observar que os isolados do coral, que agruparam em ramo independente dos demais nas filogenias construídas com os genes *pyrH* e RNAr 16S, mantiveram o posicionamento em um ramo independente sustentado por um alto bootstrap, corroborando que poderiam se tratar de uma espécie nova.

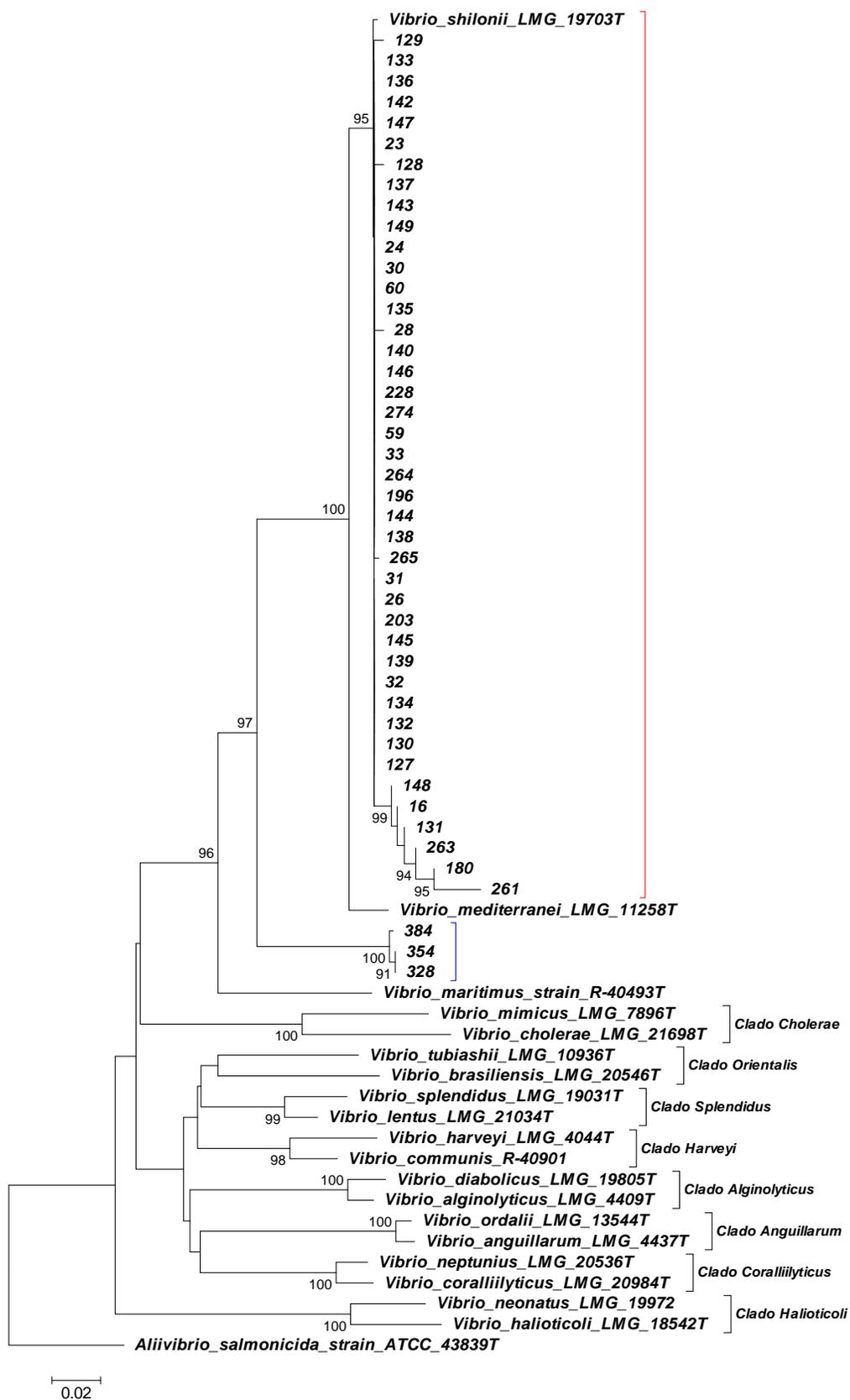
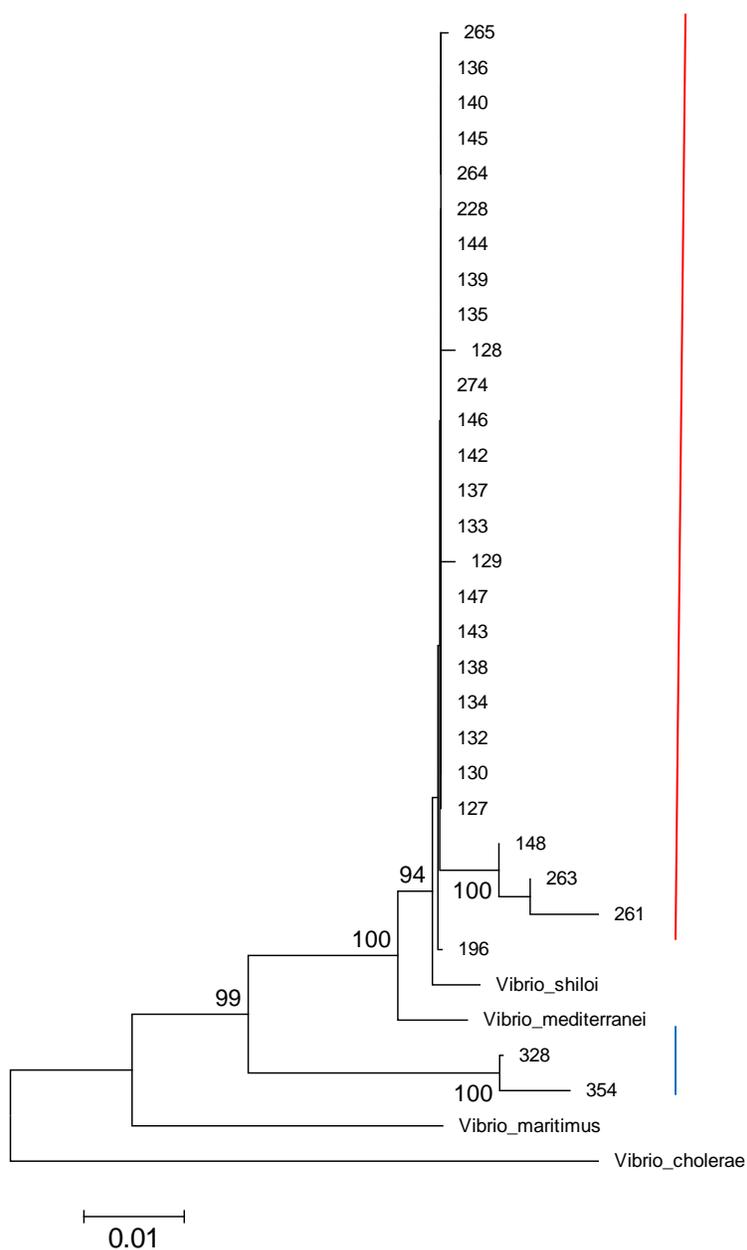


Figura 7 - Árvore filogenética baseada em sequências do gene *pyrH* (500 pb) incluindo 48 isolados e 20 linhagens tipo. Esta filogenia foi construída pelo método Neighbor-Joining utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. A espécie *Alinivibrio salmonicida* foi usada como grupo externo. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta *H. carunculata* e a linhagem tipo *V. shiloi*. O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral *M. decactis* (A-328, A-354 E A-384) . A barra representa 2% de divergência entre as sequências.



**Figura 8 -** Árvore concatenada construída com sequências parciais dos genes RNAr 16S e *pyrH* totalizando 1499 pb. Esta filogenia foi construída pelo método Neighbor-Joining utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. O grupamento apresentado dentro do colchete vermelho apresenta as sequências geradas a partir de isolado associados ao poliqueta *H. carunculata* e a linhagem tipo *V. shiloi*. O grupamento apresentado dentro do colchete azul apresenta as sequências geradas a partir de isolados associados ao coral *M. decactis*. A barra representa 1% de divergência entre as sequências.

#### 4.2 Estrutura Populacional do grupo *V. shiloi/V. mediterranei*

Analisando a estrutura populacional da espécie *V. shiloi* verificou-se que as 46 sequências do gene *pyrH* (500pb) geradas se agruparam em 14 haplótipos (Tabela 4) sendo que dois haplótipos foram formados pelas sequências das linhagens tipo *V. shiloi* (H\_1) e *V. mediterranei* (H\_2). O haplótipo mais frequente foi o H\_3 formado por 31 sequências ou aproximadamente 67% de todas as sequências. Seguiram-se os haplótipos H\_11 formado por 3 sequências, H\_5 por 2 sequências e os haplótipos H\_1, H\_2, H\_4, H\_6, H\_7, H\_8, H\_9, H\_10, H\_12, H\_13 e H\_14 formados cada um por uma única sequência (Tabela 4). Os haplótipos H\_4 e H\_5 foram formados pelas sequências geradas a partir de isolados associados ao coral *M. decactis* (A-328, A-354 e A-384). Os haplótipos H\_3, H\_6, H\_7, H\_8, H\_9, H\_10, H\_11, H\_12, H\_13 e H\_14 foram formados por sequências geradas a partir de isolados associados ao poliqueta *H. carunculata*.

Analisando a rede de haplótipos (Figura 9) verificou-se a formação de 3 grupos distintos: (1) haplótipos formados pelas sequências geradas a partir de isolados recuperados de espécimes saudáveis de *M. decactis*; (2) haplótipo formado pela sequência da linhagem tipo de *V. mediterranei*; e (3) formado pelos haplótipos composto pelas sequências de isolados associados ao poliqueta juntamente com a sequência da linhagem tipo de *V. shiloi*. Observou-se que a distância entre os haplótipos formados pelas sequências de isolados associados aos corais (H\_4 e H\_5) foi superior as distâncias entre os demais haplótipos; o número de mutações em relação

ao haplótipo formado pela linhagem tipo *V. shiloi* (H\_1) foi de 48 e em relação ao haplótipo formado pela linhagem tipo *V. mediterranei* (H\_2) foi de 51.

**Tabela 1 - Haplótipos encontrados analisando as sequências do gene *pyrH* geradas a partir dos isolados associados ao poliqueta *H. carunculata* e a espécimes de *M. decactis*, juntamente com as sequências das linhagens tipo de *V. shiloi* e *V. mediterranei*.**

Haplótipo	Sequências <i>PyrH</i>
H_1	<i>Vibrio shiloi</i>
H_2	<i>Vibrio mediterranei</i>
	60, 59, 33, 30, 274, 264, 26, 24, 23, 228, 203,
H_3	196, 149, 147, 146, 145, 144, 143, 142, 140, 139,
	138, 137, 136, 135, 134, 133, 132, 130, 129, 127
H_4	384
H_5	354, 328
H_6	32
H_7	31
H_8	28
H_9	265
H_10	263
H_11	261, 148, 131
H_12	180
H_13	16
H_14	128

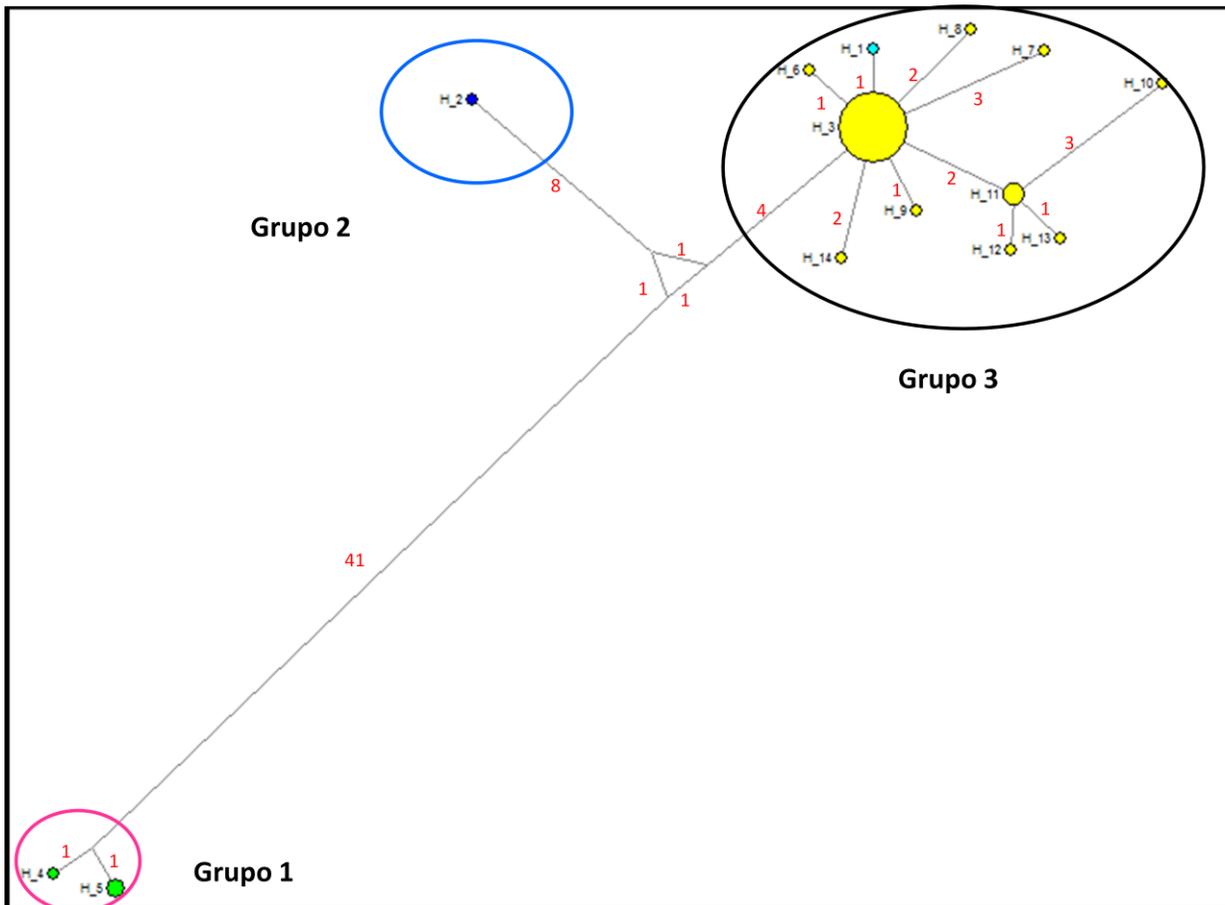
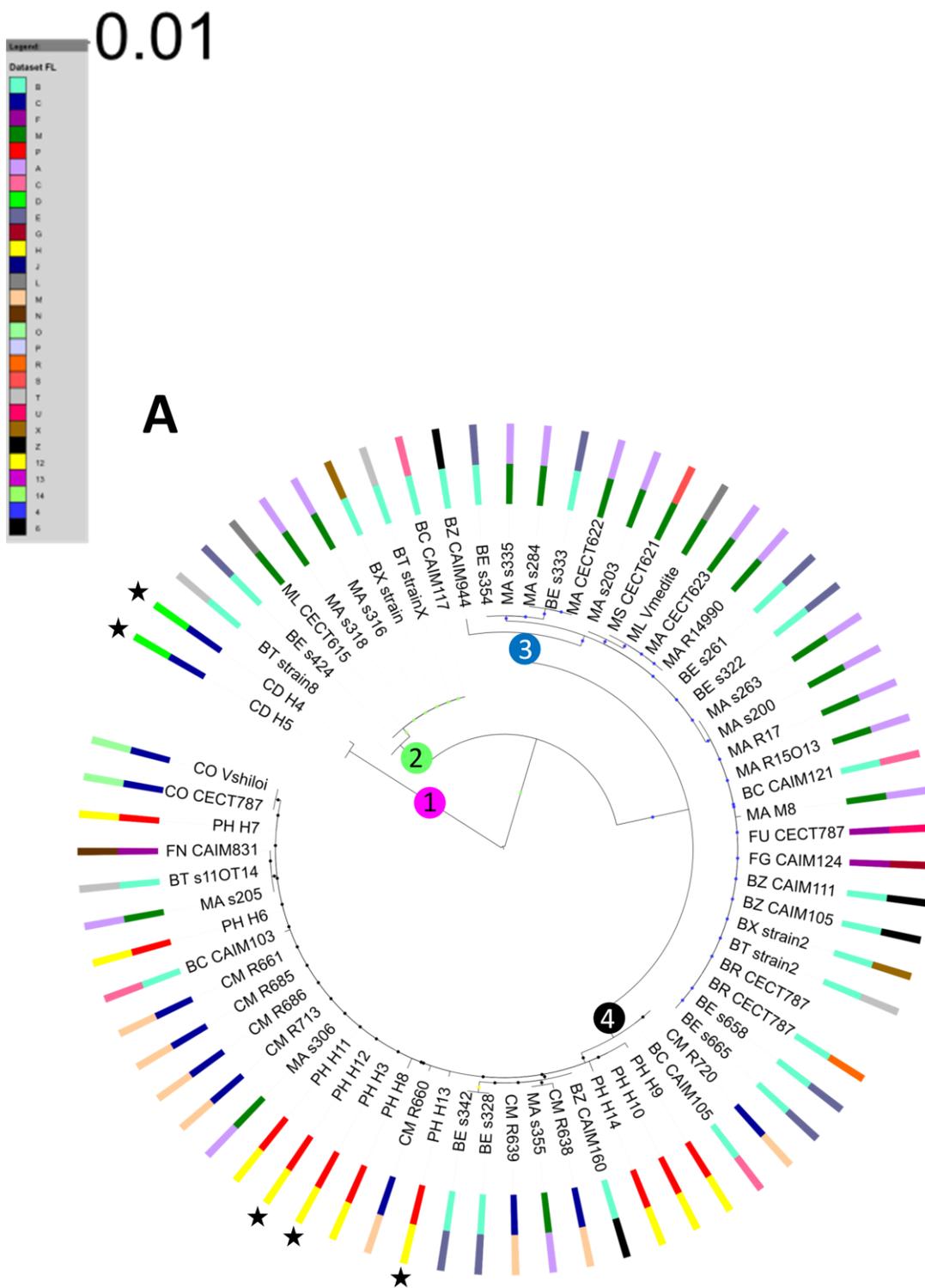


Figura 9 - Rede de Haplótipos gerada a partir das sequências do gene *pyrH* utilizando o software Network 4. 1. 1.2. O tamanho dos ícones designados para cada haplótipo tem relação direta com a frequência de sequências encontradas em cada grupo e sua coloração com a fonte de isolamento. Haplótipos em amarelo a fonte foi o poliqueta *H. carunculata*; Haplótipos em verde: a fonte foi *M. decactis*; Haplótipo em azul: linhagem tipo de *V. shiloi*; Haplótipo azul em escuro: linhagem tipo *V. mediterranei*. Em vermelho: número de mutações em dado intervalo que separam os haplótipos.

Os haplótipos formados na análise do software DNAsp juntamente com linhagens de *V. mediterranei*/*V. shiloi* isoladas de diferentes fontes e retiradas do GenBank, (NCBI, 2013) foram analisadas em conjunto com a finalidade de entender se as diferenças na composição de nucleotídeos encontradas entre as sequências de *pyrH* refletiriam uma diferença ecológica entre as possíveis populações encontradas. Além de tentar elucidar a evolução ecológica do grupo *V. shiloi*/*V. mediterranei*, principalmente com relação à associação destas linhagens com hospedeiros (Figura 10).

As análises sugerem que de uma linhagem comum, pertencente ao habitat ancestral, duas populações divergiram há um longo período evolutivo. Durante o período de divergência uma dessas populações se associou ao coral *M. decactis* (população 1- habitat A) e outra teria, preferencialmente, adotado o estilo de vida livre e em associação com bivalves (população 2 – habitat B). Deste segundo habitat (B) surgem outras duas populações, uma que possui o mesmo estilo de vida que o ancestral (população 3 – habitat C - vida livre/bivalve) e outra com o estilo de vida diferente, associada principalmente a corais (*M. hispida* e *O. patagonica*) e ao poliqueta *H. carunculata* (população 4 – habitats D e E) (Figuras 10 A e B; 11 e 12).



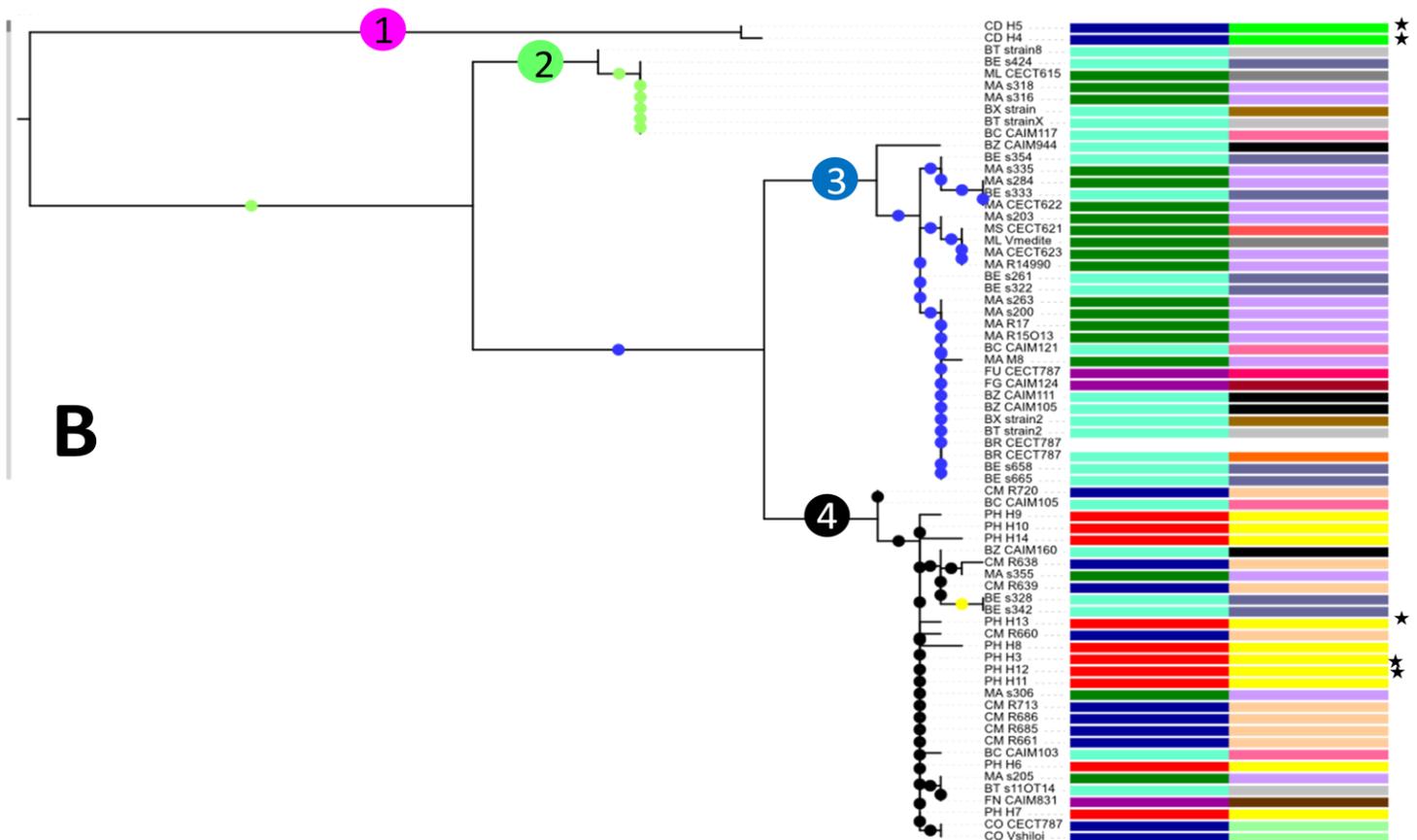


Figura 10 – Análise das populações de *V. mediterranei*/*V. shiloi* com base em sequências do gene *pyrH* (416pb) e a fonte de isolamento. Fonte de isolamento: CD – Coral; *M. decactis*/ CM -Coral; *M. hispida*/ CO- Coral; *O. patagonica* / PH – Poliqueta; *H. carunculata*/ ML – plâncton marinho/ MS – sedimento marinho/ MA- água do ma/ BC – Ostra; *C. cortestensis*/ BR – Bivalve; *R. philippinarum*/ BE – Bivalve; *M. edulis*/ BT – Bivalve; *O. edulis*/ BX – Bivalve; *Donax sp.*/ BZ – Bivalve; *C. gigas*/ FN – Peixe; *S. anulatus*/ FG – Peixe; *L. guttatus*/ FU - Peixe; *S. aurata*/ FJ – Peixe; Salmão – *A. salmoniacida*- grupo externo) ; habitats previstos (5) nos nodos parentais e populações (4) preditas representadas pelos círculos grandes dentro da análise de linhagens do grupo *V. shiloi* / *V.mediterranei*. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método de verossimilhança com bootstrap de 1000 repetições. Para os isolados em estudo (Tabela 1) foi utilizada a divisão de haplótipos (H1 – H14) geradas pelo software DNAsp. As estrelas destacam os haplótipos dos quais linhagens foram selecionadas para a realização dos bioensaios de patogenicidade. A- Apresentação da árvore no formato circular, mostrando o habitat projetado do ancestral para cada linhagem e as populações formadas . B – Apresentação da árvore no formato tradicional mostrando o habitat projetado do ancestral para cada linhagem no nodo parental. A barra representa 1% de divergência entre as sequências. *V. cholerae* foi usado como grupo externo

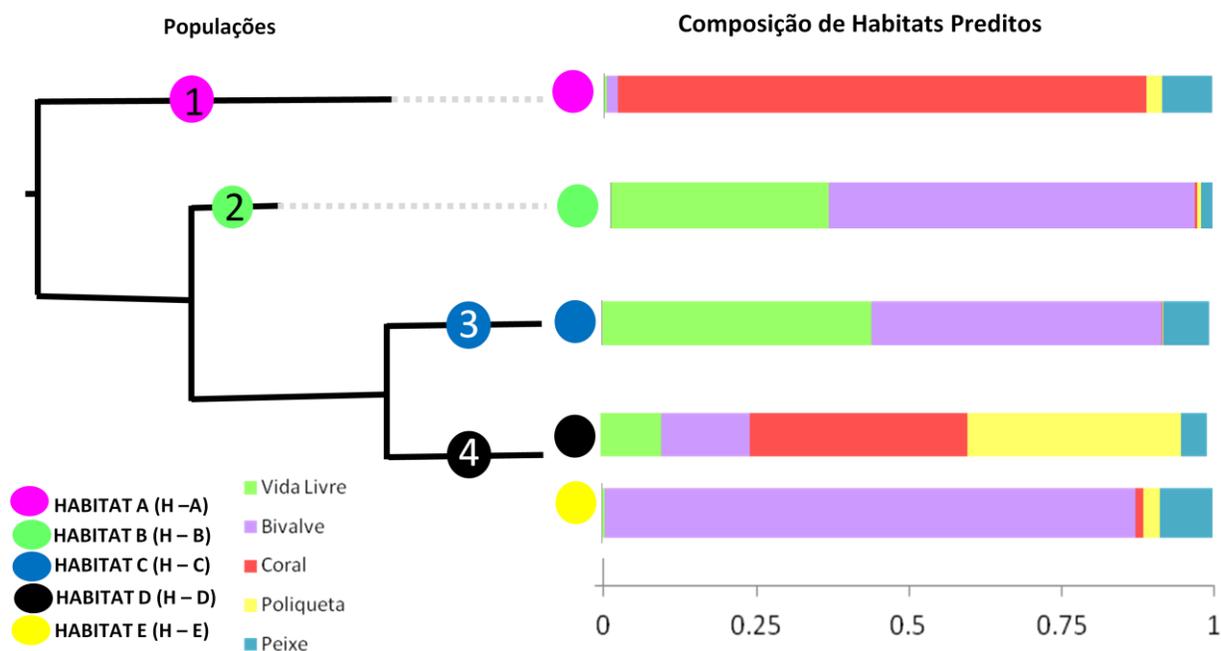
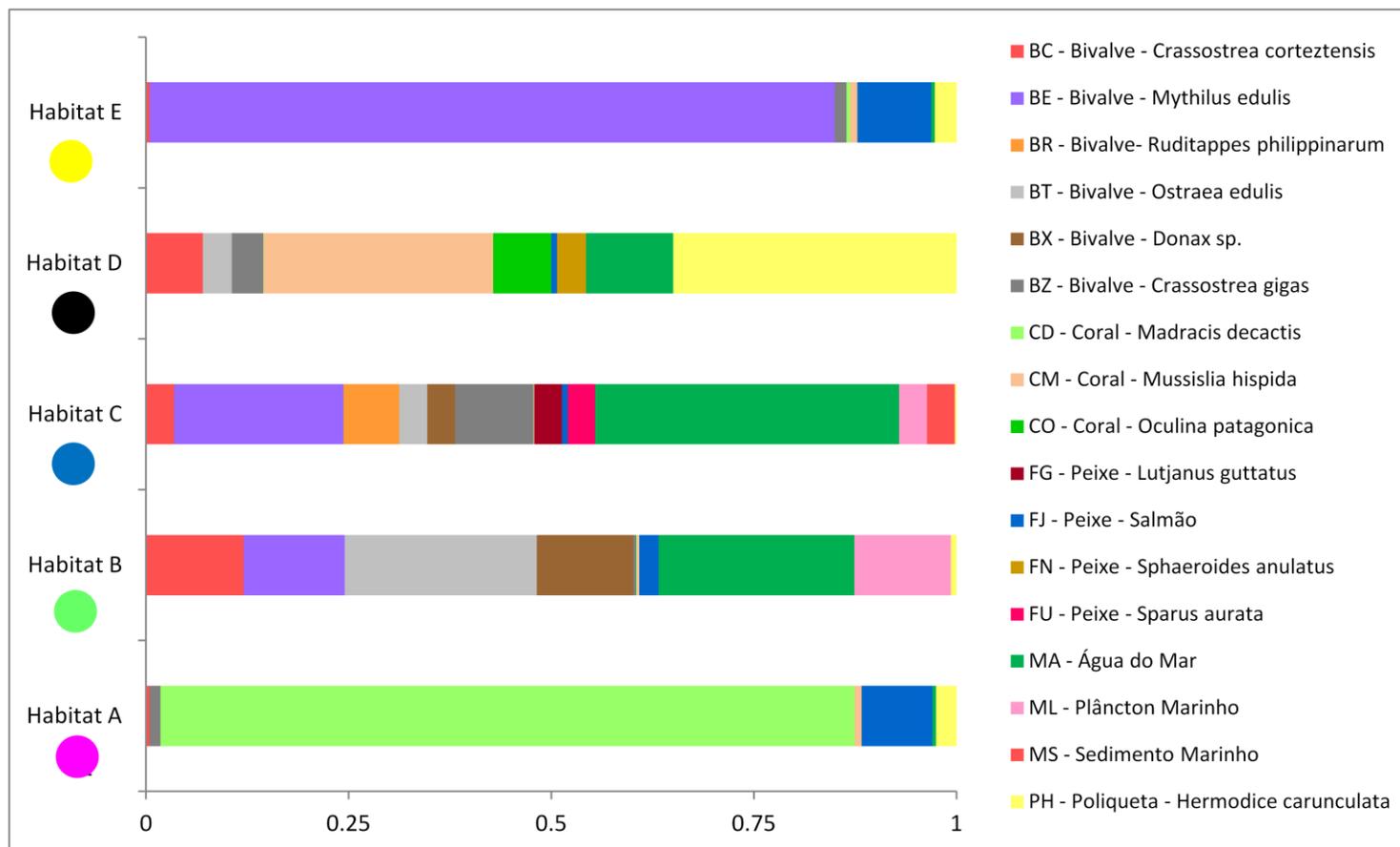


Figura 11 – Árvore ultramétrica sumarizando os habitats e as populações associadas identificadas pelo modelo e a composição de cada habitat predito de acordo com os grupos de isolamento [Vida Livre (água do mar, sedimento marinho e plâncton marinho), Bivalve (*M. edulis*, *R. philippinarum*, *O. edulis*, *Donax sp.*, *C. cortestensis* e *C. gigas*), Coral (*O. patagonica*, *M. decactis* e *M. hispida*), Poliqueta (*H. carunculata*) e Peixe (*S. anulatus*, *L. guttatus*, *S. aurata* e Salmão – *A. salmonicida* – grupo extremo)]. As cores dos habitats são as mesmas dos círculos grandes da Figura 13. A composição dos habitats pelos grupos de isolamento foi inferida pelo modelo.



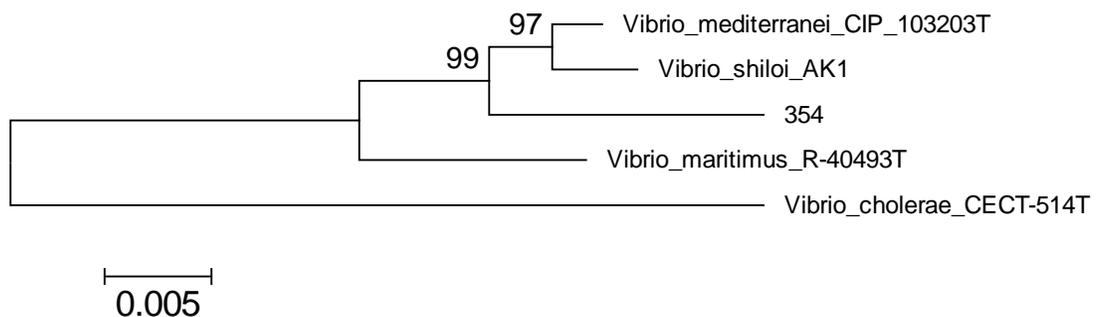
**Figura 12 - Composição de habitats encontrados pelo modelo de acordo com as espécies das quais as linhagens de *V. shiloi*/ *V. mediterranei* foram isoladas. O hospedeiro das linhagens retiradas do GenBank foi identificado de acordo com a fonte informada no banco de dados ou pelo trabalho citado como referência.**

O algoritmo identificou quatro populações distintas associadas a cinco habitats diferentes (Figura 11). O primeiro habitat (H-A) corresponde a população associada ao coral *M. decactis*. O segundo par de habitats (H-B e H-C) corresponde a populações associadas principalmente a bivalves e de vida livre. O terceiro habitat (H –D) corresponde a populações associadas aos corais *M. hispida* e *O. patagonica* e ao poliqueta *H. carrunculata*. O quarto habitat (H-E) corresponde a linhagens associadas a uma espécie de bivalve *M. edulis*, porém estas não formaram um população distinta, fazem parte da população composta principalmente por isolados de corais e poliqueta.

Analisando os resultados obtidos observamos um alto grau de associação entre as linhagens de vida de livre e aquelas associadas a bivalves. Dois dos habitats preditos encontrados foram formados principalmente por linhagens com esse estilo de vida (Vida livre e Bivalves) (H-B e H- C). Esses estilos de vida também foram encontrados no habitat formado principalmente por isolados associados a corais e poliquetas porém contribuem menos para a formação destes habitats (Figuras 11 e 12). Todas as linhagens associadas aos corais *M. hispida* e *O. patagonica* formaram um único habitat (H-D) juntamente com as linhagens associadas ao poliqueta *H. carunculata*, com exceção do Habitat A, explicado por linhagens associadas ao coral *M. decactis*.

#### 4.3 Caracterização da potencial espécie nova irmã de *V. shiloi*

A partir das análises tanto taxonômicas quanto populacionais, verificou-se a necessidade de um aprofundamento na taxonomia das linhagens, A-328, A-354 e A-384, encontradas em associação com espécimes de *M. decactis*. A linhagem A-354 foi escolhida, como representante deste grupo. Inicialmente foi feito o sequenciamento do gene RNAr 16S completo (Figura 13). A árvore gerada confirmou o posicionamento observado para essa linhagem nas figuras 7 e 8. A identidade de nucleotídeos de A-354 em relação a *V. shiloi* AK1<sup>T</sup> foi de 10.2%. Comparando com *V. mediterranei* LMG11258<sup>T</sup> foi de 9.6 %.



**Figura 13** - Análise filogenética baseada nas sequências completa do gene RNAr 16S (1430 pb). Esta filogenia foi construída pelo método Tamura-Nei utilizando a distância evolutiva definida pelo método Tamura- Nei. Posições ambíguas foram analisadas par a par (Parwise deletion). O bootstrap está expresso em porcentagens após 1000 repetições, sendo apresentado somente os valores maiores que 70%. A barra representa 5% de divergência entre as sequências. *V. cholerae* foi utilizado como grupo externo.

Em seguida foi realizada a determinação do  $\Delta T_m$ . A comparação incluiu as linhagens *V. shiloi* AK1<sup>T</sup>, *V. mediterranei* LMG 11258<sup>T</sup>, A-203 e A-354.

As concentrações de DNA obtido e as razões entre as absorvâncias (260, 280 e 230nm), indicadoras da pureza do DNA, estão expressas na tabela abaixo.

**Tabela 2 - Concentração de DNA, valores das razões entre as absorvâncias a 260, 280 e 230nm (A260/A280; A260/A230) das linhagens utilizadas nos experimentos de  $\Delta T_m$ .**

Linhagem	[ ] DNA ng/ $\mu$ l	A260/A280	A260/A230
203	461.9	1.88	2.2
354	431.1	1.88	2.1
<i>V. shiloi</i> AK1T	360.5	1.9	2.2
<i>V. mediterranei</i> LMG 11258T	485.6	1.86	1.87

Os valores determinados para o conteúdo GC (%GC) estão descritos na tabela abaixo. Os valores de conteúdo GC descritos na literatura para as linhagens tipo *V. shiloi* LMG 19703<sup>T</sup> (=AK1<sup>T</sup>) e para *V. mediterranei* LMG 11258<sup>T</sup> são respectivamente 43.2 e 44.1% (THOMPSON *et al.*, 2001).

**Tabela 3 - Valores de  $T_m$  e conteúdo %GC obtidos para as linhagens foco e linhagens tipo utilizadas para os experimentos de  $\Delta T_m$ . Os valores de %GC foram calculado a partir da fórmula %mol G+C= (1.5617 $T_m$ -77.841) (MOREIRA *et al.*, 2011).**

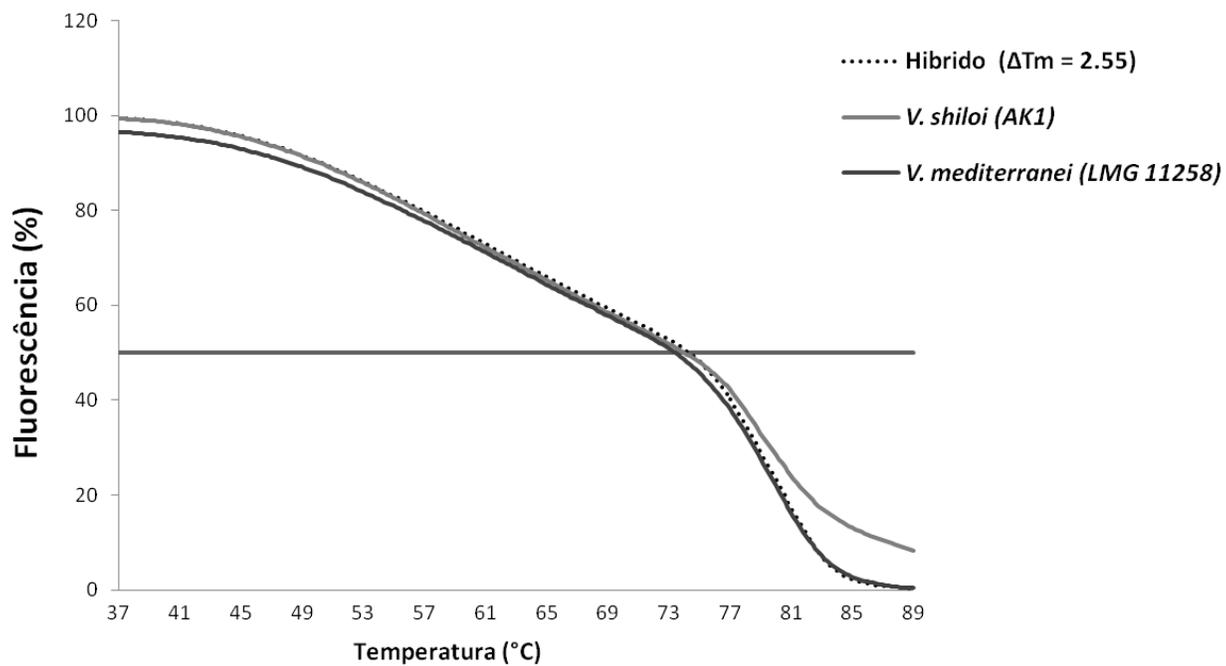
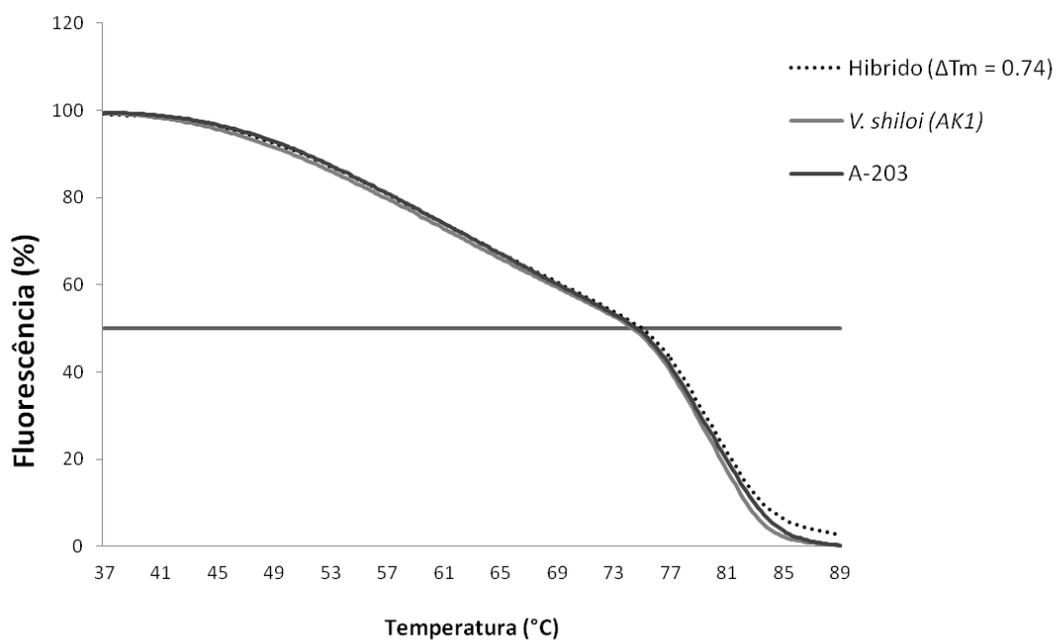
Linhagem	$T_m$ médio	E. P.	%mol G+C	Valor Literatura	Referência
203	78.06	0.11	44.07	-	-
354	78.03	0.32	44.03	-	-
<i>V. shiloi</i> AK1T	77.31	0.23	42.9	43.2	(Thompson <i>et al.</i> , 2001a)
<i>V. mediterranei</i> LMG11258T	77.58	0.12	43.33	44.1	(Thompson <i>et al.</i> , 2001a)

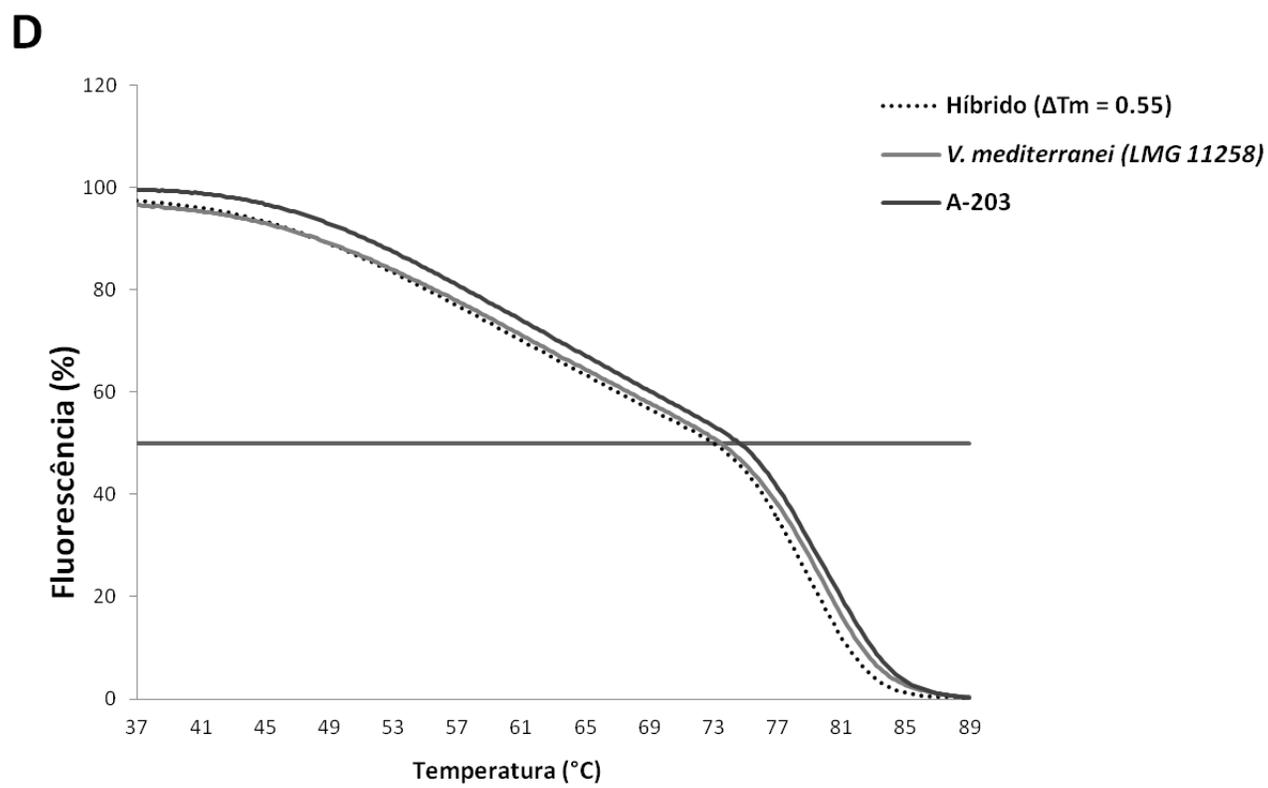
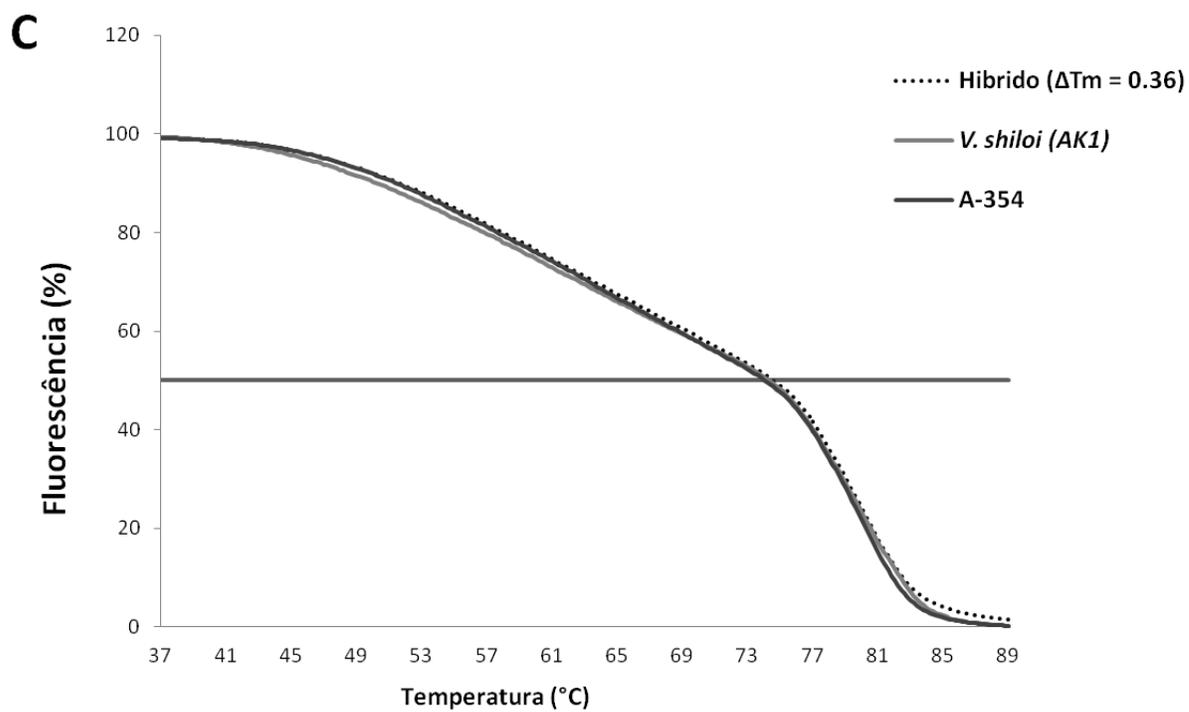
Para a realização dos experimentos de  $\Delta T_m$  foram produzidos os seguintes híbridos: A-203 x A-354; A-203 x AK1<sup>T</sup>; A-354 x AK1<sup>T</sup>; AK1<sup>T</sup> x LMG 11258<sup>T</sup>; 203 x LMG 11258<sup>T</sup> e A-354 x LMG 11258<sup>T</sup>. O experimento foi feito em quadruplicata e o experimento repetido duas vezes.

A tabela a seguir sumariza os resultados obtidos nos experimentos, informando as  $T_m$ s e o  $\Delta T_m$  obtido. A medida de erro empregada foi o Erro Padrão. As curvas de desnaturação estão apresentadas na figura 11.

**Tabela 4- Valores de  $\Delta T_m$  obtidos para para as linhagens usadas neste estudo. À esquerda os valores de  $\Delta T_m$  em relação aos DNAs homólogos, à direita o  $\Delta T_m$  (média dos resultados obtidos aos homólogos).**

	Linhagens	$T_m$	E.P.				
Homólogos	<i>V. shiloi</i> (AK1) X <i>V. shiloi</i> (AK1)	74.00	0.12				
	<i>V. mediterranei</i> (LMG11258) X <i>V. mediterranei</i> (LMG11258)	73.43	0.23				
	203 X 203	74.60	0.22				
	354 X 354	74.05	0.47				
Híbridos	<i>V. shiloi</i> (AK1) X <i>V. mediterranei</i> (LMG11258)	74.25	0.25	$\Delta T_m$ Homólogo 1	$\Delta T_m$ Homólogo 2	Média $\Delta T_m$	E.P.
	<i>V. shiloi</i> (AK1) X 203	75.00	0.20	0.25	0.82	0.54	0.21
	<i>V. shiloi</i> (AK1) X 354	74.58	0.13	1.00	0.40	0.70	0.57
	<i>V. mediterranei</i> (LMG11258) X 203	73.33	0.63	0.58	0.53	0.55	0.49
	<i>V. mediterranei</i> (LMG11258) X 354	74.58	0.13	1.15	0.53	0.84	0.71
	203 X 354	75.25	0.13	0.65	1.20	0.92	0.02

**A****B**



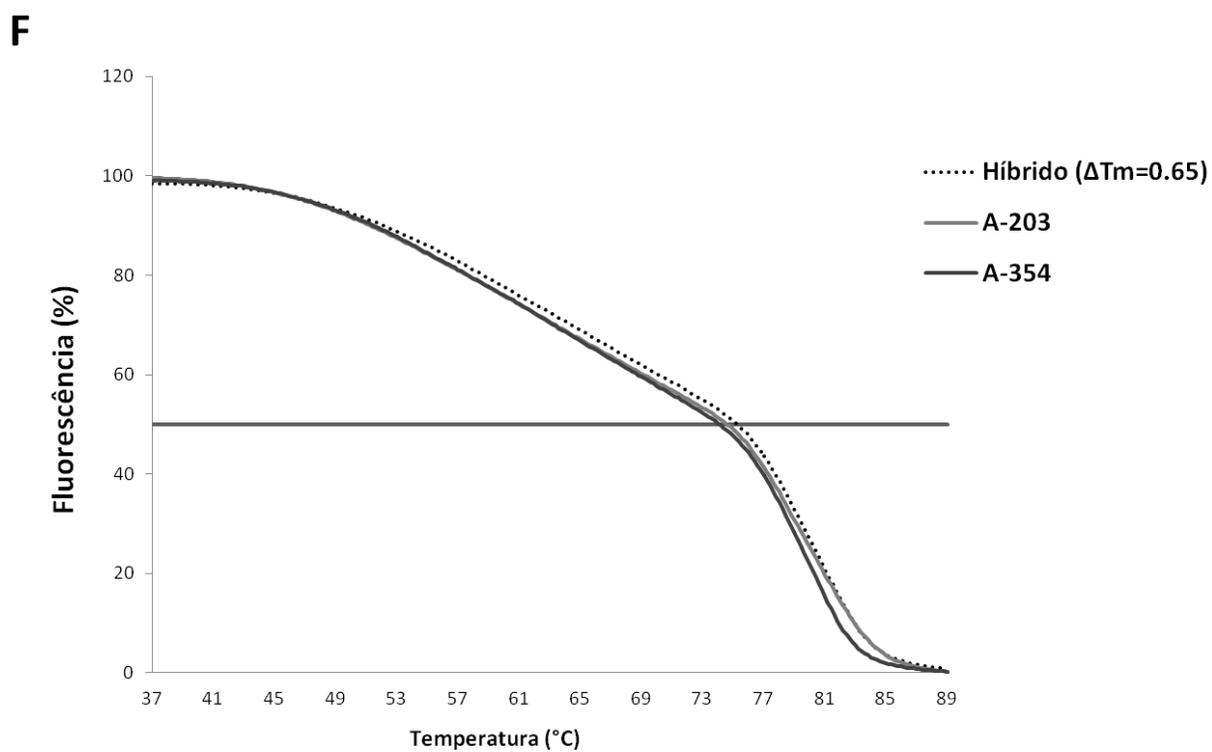
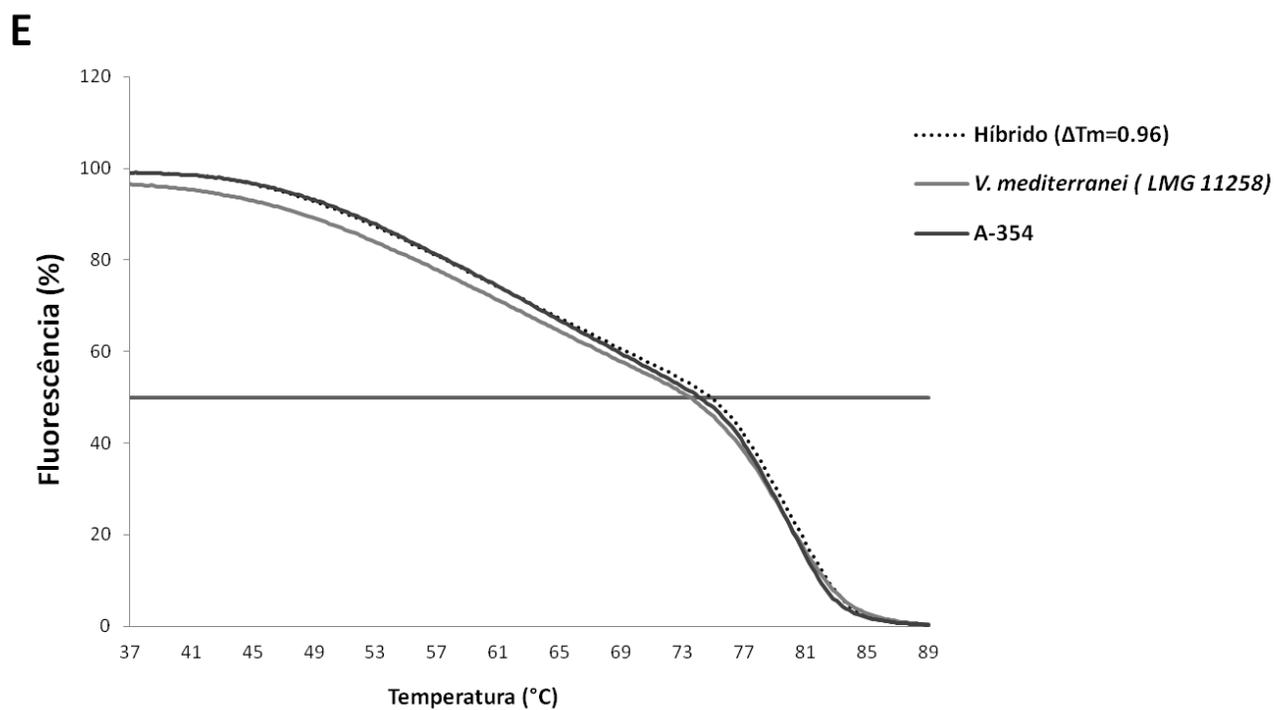


Figura 14 - Curvas de desnaturação e o respectivo  $\Delta T_m$  obtido ( A: AK1<sup>T</sup> x LMG11258<sup>T</sup> -  $\Delta T_m= 2.55$ , B: AK1<sup>T</sup> x A- 203 -  $\Delta T_m= 0.74$ ; C: AK1<sup>T</sup> x A-354 -  $\Delta T_m=0.36$  , D: LMG11258<sup>T</sup> x A-203 -  $\Delta T_m=0.55$ , E:

LMG11258<sup>T</sup> X A-354 -  $\Delta T_m=0.96$  e F: A-203XA-354 -  $\Delta T_m=0.65$ ). Os homólogos são representados com linhas cheias e os híbridos com linhas tracejadas. A curva paralela ao eixo X, indica a temperatura na qual foi observada % fluorescência, e portanto as  $\Delta T_{ms}$ .

O  $\Delta T_m$  para o par AK1<sup>T</sup> X A-203 foi de 0,74°C; para o par LMG11258<sup>T</sup> X A-203 foi de 0,55°C ; para o par AK1<sup>T</sup> X A-354 foi de 0,36°C; para o par LMG11258<sup>T</sup> X A-354 foi de 0,96°C; para o par AK1<sup>T</sup> X par LMG11258<sup>T</sup> foi de 2,55°C, sendo todos os valores inferiores ao corte de 5,0°C, definido para o delineamento de espécies distintas.

#### 4.4 Patogenicidade de isolados do grupo *V.shiloi/V. mediterranei*

Devido a diversidade de populações encontradas, da diversidade da composição de nucleotídeos nas sequências do gene *pyrH* e das árvores filogenéticas construídas, foram selecionados isolados representativos da espécie *V. shiloi* para a realização de teste de patogenicidade utilizando artêmia. Foram escolhidas as linhagens A-203, A-16 e A-180 como representantes da diversidade dos isolados associados ao poliqueta *H. carunculata* e população 4 e as linhagens A-328, A-354 e A-384 associadas aos corais saudáveis de *M. decactis* e representante da população 1.

No teste de patogenicidade (Figura 15) verificamos que a taxa de sobrevivência nos ensaios com as linhagens A-384 e A-354 foi significativamente menor em comparação com o controle (\*;  $p<0,001$ ), na concentração de  $10^{-8}$  CFU/ mL para a linhagem A-384 e  $10^{-7}$  CFU/ mL para a linhagem A-354. A taxa de sobrevivência média da linhagem A-384 foi de 62% e a linhagem A-354, mesmo estando em concentração 10X menor, foi de 56% enquanto a taxa do controle foi de 86%. As linhagens A-16 e A-180 não possuíram um efeito negativo na sobrevivências das artêmias tendo suas taxas de sobrevivência 87% e 84% respectivamente. Por outro lado, a linhagem A-203 possui um efeito significativamente positivo na sobrevivência (\*\*;  $p<0,001$ ), tendo sua taxa de sobrevivência de 96%. Foi realizado experimento preliminar com a linhagem tipo *V. shiloi* AK1<sup>T</sup> onde não foi observado efeito sobre a mortalidade das artêmias, porém este resultado não pode ser considerado. Não foi alcançada a concentração desejada no inóculo dessa bactéria e não houve tempo hábil para a repetição.

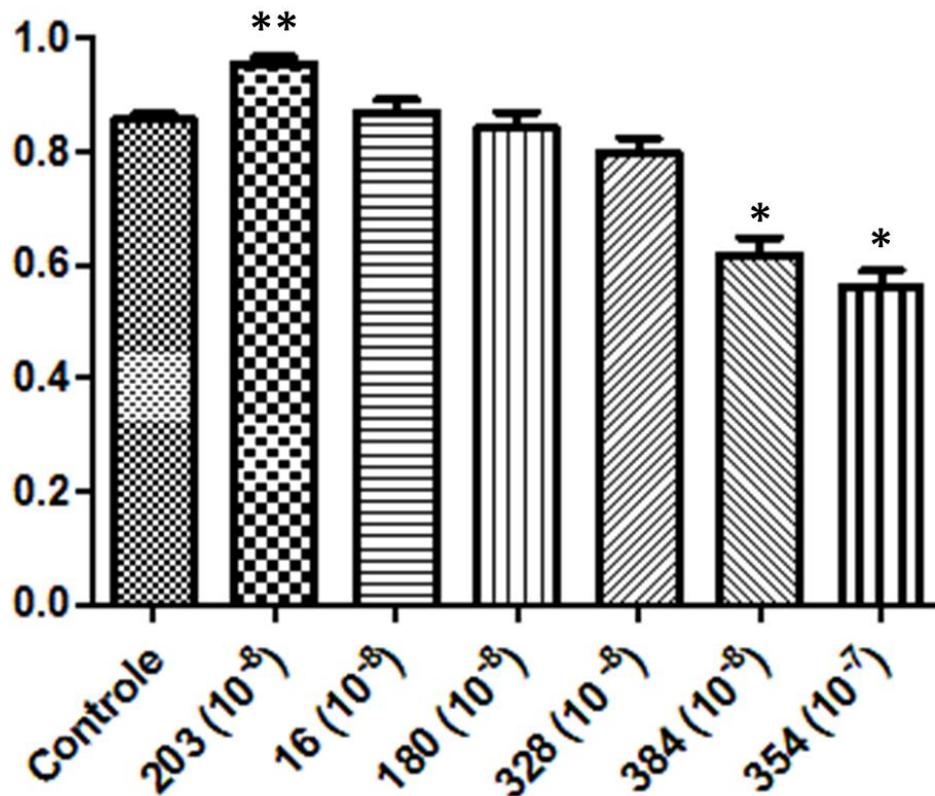


Figura 15 - Teste de patogenicidade com as linhagens de *V. shiloi* representativa de toda diversidade encontrada dessa espécie no coral *M. decactis* e no poliqueta *H. carunculata*. As linhagens A-384 e A-354 tiveram um efeito negativo (\*) na sobrevivência das artêmias enquanto a linhagem A-203 teve um efeito positivo (\*\*).

#### 4.5 Genes ligados à virulência das linhagens de *V. shiloi* (A-203 e A-354)

Os genes associados à virulência encontrados na análise dos genomas completos das linhagens de *V. shiloi* descritas nesse estudo (A-203 e A-354) assim como uma comparação com os genes ligados à essa função da linhagem tipo de *V. shiloi* AK1<sup>T</sup> estão descritos na tabela abaixo.

**Tabela 5 - Genes associados a virulência encontrados nos genomas de duas linhagens de *V. shiloi* descritas neste estudo (A-203 e A-354), comparando os resultados obtidos com a linhagem tipo *V. shiloi* AK1<sup>T</sup>**

Subsistema		Genes Ligados à Virulência	Linhagens/ Número de Genes		
			AK1	A-203	A-354
Virulência, Doenças e Defesa	Toxinas e Superantígenos	Toxina Colérica	4	0	0
	Bacteriocinas, Peptídeos Antibacterianos Sintetizados por Ribossomos	Tolerância a Colicina E2	1	0	1
		Colicina V e Grupo de produção de Bacteriocinas	10	15	0
Fagos, Profagos, Elementos Transponíveis e Plasmídeos	Elementos Transponíveis	CBSS-203122.12.peg.188	0	9	0
	Fagos e Profagos	Replicação de Fagos	4	6	0
		Proteínas de Capsídeo de Fagos	1	1	0
		Síntese de DNA de Fagos	3	0	4
		Proteína da Fibra da Cauda de Fagos	1	0	0
		Proteína " <i>Phage shock</i> "	5	0	4
Aquisição e Metabolismo de Ferro	Sideróforos	Kit de montagem do Sideróforo	8	0	4
		Sideróforo Aerobactina	8	11	16
		Síntese de Vibrioferrina	0	0	4

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro que visa relacionar as populações de *V. shiloi* aos hospedeiros (coral *M. decactis* e poliqueta *H. carunculata* e outros) e habitats, assim como a estrutura e dinâmica populacional da bactéria nestas relações ecológicas. Adicionalmente, o potencial patogênico de isolados representativos das populações estudadas foi determinado. Este trabalho complementa o trabalho "Culturable heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached *Madracis decactis* and the fireworm *Hermodice carunculata* from the remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil" aceito para publicação no jornal current Microbiology (MOREIRA *et al.*, 2013).

A análise taxonômica utilizando o gene RNAr 16S foi realizada para identificar vibrios puntativos (isolados em meio seletivo para *Vibrio* – TCBS – Moreira *et al.*, 2013) e cuja amplificação do gene *pyrH* não foi possível com os iniciadores preferenciais (80F/530R – não degenerados). A partir das sequências parciais desse gene, observou-se que a maioria desses isolados pertencem ao grupo *V. shiloi*/*V. mediterranei*.

Para a amplificação do gene *pyrH* o par de iniciadores preferencial (não degenerados) é 80F (direto) e 530R (inverso) com a temperatura de anelamento de 55°C, condição que não foi bem sucedida nesse estudo. Nos testes com diferentes iniciadores que amplificam esse gene, os resultados mostraram que a melhor combinação é o par 4F (direto) e 530R (inverso) com a temperatura de anelamento de 54°C. Isso indica que possivelmente esse gene apresenta uma modificação na região de anelamento do iniciador direto. Como o 4F é degenerado a amplificação foi possível (THOMPSON *et al.*, 2005). Com a análise das sequências geradas nestas condições verificou-se que a maioria dos isolados são *V. shiloi*. Três sequências (dos isolados A-328, A-354 e A-384) apresentaram similaridade menor que 94% em relação a linhagem tipo (AK1<sup>T</sup>), suscitando a possibilidade de serem uma espécie nova.

A discussão da análise taxonômica destes isolados está no **item 5.2**.

O fato de linhagens de *V. shiloi* estarem presentes em corais aparentemente saudáveis, poderia ser uma indicação de que os hospedeiros iriam desenvolver os sintomas da infecção (branqueamento) em futuro breve, conforme sugerido anteriormente (ISRAELY *et al.*, 2001) ou que essas linhagens houvessem adquiridos ao longo da sua evolução um potencial genético para sobreviver dentro do tecido do coral, mesmo em condições adversas.

Devido a diversidade encontrada entre isolados do grupo *V. shiloi/V. mediterranei*, foram feitas análises da estrutura populacional desse grupo. Os objetivos foram determinar os haplótipos e suas frequências assim como verificar se as diferenças na composição de nucleotídeos das sequências do gene *pyrH* refletem uma diferenciação ecológica ou a formação de populações distintas. Além disso, através das análises realizadas, se pretendeu visualizar uma evolução ecológica das interações ecológicas deste grupo.

### 5.1 Estrutura populacional do grupo *V. shiloi/V.mediterranei*

A rede de haplótipos (Figura 9) possui o padrão estrelado, sugerindo que esta população vem sofrendo diversificação recente (MORTIMER and VAN VUUREN, 2007). O haplótipo mais frequente (H\_3), conecta todos os haplótipos encontrados. A distância entre esse haplótipo mais frequente e todos os demais formados por sequências provenientes de

linhagens associadas ao poliqueta (H\_6, H\_7, H\_8, H\_9, H\_10, H\_11, H\_12, H\_13 e H\_14) e da linhagem tipo de *Vibrio shiloi* (H\_1) varia de uma a cinco mutações. Essa variação  $\leq 1\%$  sugere que estes haplótipos são provenientes de uma única população. No entanto a distância entre H\_3 e o haplótipo formado pela sequência da linhagem tipo de *V. mediterranei* (H\_2) foi de aproximadamente 3%. Entre H\_3 e os haplótipos formados por sequências de linhagens associadas ao coral *M. decactis* (H\_4 e H\_5) foi de aproximadamente 10% indicando que estes grupos de haplótipos (H\_2, H\_4 e H\_5) podem representar uma população diferente. A população representada pelo haplótipo oriundo da linhagem tipo de *V. mediterranei* (H\_2) assemelha-se mais à população composta por linhagens associadas ao poliqueta, juntamente com a linhagem tipo de *V. shiloi* (H\_1) do que a população representada pelos haplótipos oriundo das linhagens associadas ao coral *M. decactis* (H\_4 e H\_5). Não há um limiar relativo à diferença na composição de nucleotídeos que separe populações bacterianas, porém Palys e colaboradores (PALYS *et al.*, 1997) sugerem que populações ou grupos de bactérias apresentam, em média 1%, ou menos de divergência na sua composição de nucleotídeos de um ou conjunto de genes “house keeping”. A alta similaridade entre sequências que compõem a mesma população é moldada por eventos de seleção periódicos que de tempos em tempos purgam a diversidade em todos os *loci* de determinada população (COHAN, 2001, FRASER *et al.*, 2009). Um exemplo interessante é o caso das espécies intimamente relacionadas e ecologicamente distintas *Streptococcus pneumoniae* (patógeno humano), *S. mitis* (bactéria comensal) e *S. pseudopneumoniae* (status ecológico incerto) há diferenças peculiares quanto a composição de nucleotídeos em sequências de genes “house keeping”. A diferença média entre linhagens de *S. pneumoniae* é de 1.2%, entre linhagens de *S. pseudopneumoniae* é de 3.0% e de *S. mitis* pode ser maior que 5.0%, sendo a distância entre dois genótipos aleatórios de *S. mitis* similar a distância à distância média entre genótipos de *S. pseudopneumoniae* e *S. pneumoniae* (5.1%). Indicando que o uso de um valor fixo de divergência de sequências para diferenciar essas espécies iria ou reagrupar *S. pseudopneumoniae* e *S. pneumoniae* ou dividir as linhagens de *S. mitis* em espécies diferentes (FRASER *et al.*, 2009).

Ao analisar os haplótipos gerados neste trabalho juntamente com sequências do gene *pyrH* de outras linhagens de *V. mediterranei* disponíveis no GenBank (NCBI, 2013), e

considerando o habitat inicial de cada uma a sua fonte de isolamento foi verificada a formação de quatro populações diferentes, cada qual ocupando um habitat específico. A população 1 ocuparia um habitat específico e único (Habitat A- explicado pelos estilos de vida: livre e em associação com bivalves) que na análise da rede de haplótipos é representada pelo grupo 1. As populações dois e três ocupariam habitats similares (Habitat B e C), o que se conclui da divisão dos grandes grupos quanto às fontes de isolamento (Figura 11). Porém ao analisarmos o gráfico construído com os hospedeiros das quais foram isoladas as linhagens (Figura 12), verificamos uma diferença na composição de cada habitat sendo aquele correspondente à população 3 mais diverso que o da população 4. A população 4 ocuparia dois habitats diferentes (Habitats D e E/ D: explicado por linhagens oriundas dos corais *M. hispida* e *O. patagonica* e E: explicado por linhagens oriundas do bivalve *M. edulis*), parte das linhagens que compoem a população 4 são equivalentes ao grupo 3 na rede de haplótipos. Dessa forma, e segundo o conceito de ecótipo (um grupo de linhagens que ocupa o mesmo ou similar nicho ecológico e que podem ser identificado como um grupo monofilético nas análises filogenéticas) (COHAN, 2001) , detectamos quatro ecótipos diferentes, cada um sendo formado por uma população detectada (1 a 4) (Figura 10). Ainda segundo este conceito, cada ecótipo deve corresponder a uma espécie já que estes seriam unidades evolutivas irreversivelmente separadas, com suas próprias tendências e história evolutiva (COHAN, 2001). De acordo com esse conceito, detectamos duas espécies diferentes no conjunto de haplótipos oriundos das linhagens em estudo (Tabela1, Figura 9), (1) a primeira representadas pelos haplótipos oriundos das linhagens associadas ao coral *M. decactis* (em vermelho na Figura 9; População 1 – rosa- nas Figuras 10, 11 e 12), que pode ser considerada pertencente à espécie *V. shiloi* (em azul claro na Figura 9) e que não está relacionada a nenhuma outra espécie de *Vibrio* descrita, uma vez que ecologicamente se distingue das linhagens mais próximas segundo a identidade de sequência do gene RNAr 16S; e (2) a segunda representada, pelos haplótipos oriundos das linhagens associadas ao poliqueta (em amarelo na Figura 9; População 4 – preta- nas Figuras 10, 11 e 12). Também de acordo com essa abordagem observamos a distinção entre as linhagens tipo de *V. shiloi* e *V. mediterranei*, que formam ecótipos diferentes, conceitualmente, portanto, e duas espécies diferentes

(haplótipos em azul claro e azul escuro, respectivamente na Figura 9 e População 4 – preta e População 3 – azul, respectivamente nas Figuras 10, 11 e 12).

A estrutura filogenética das população também revela a evolução das mudanças de habitats. Populações formadas por ramos profundos devem estar associadas ao habitat correspondente por um longo período evolutivo, enquanto ramos mais rasos, indicam grupos com maior probabilidade de diversificação (HUNT *et al.*, 2008). Os habitats apontados nas análises realizadas com o software ADAPTML foram preditos por um algoritmo empírico. Hunt e colaboradores (HUNT *et al.*, 2008), ao utilizar esse modelo para analisar se havia partição de recursos na coluna d'água para o gênero *Vibrio*, verificaram alto nível de especialização para algumas populações (ex: *V. ordalli*, somente encontrado na forma de vida livre) enquanto outras espécies mostraram-se generalistas, pois eram capazes de colonizar uma variedade de superfícies na coluna d'água, incluindo partículas orgânicas e zooplâncton. A maioria das populações preditas pelo modelo, seriam divergentes há um longo período evolutivo, devido à profundidade dos ramos. Além disso os grupos filogenéticos observados, em sua maioria, condizem com a divisão de espécies dentro desse gênero (HUNT *et al.*, 2008). No entanto, a exceção observada por Hunt e colaboradores para a espécie *V. splendidus*, se repetiu para *V. shiloi/V. mediterranei* nesse estudo. As linhagens de *V. shiloi/V. mediterranei* se dividiram em inúmeros subgrupos intimamente relacionados, com preferências ecológicas distintas, indicando a possibilidade de radiação ecológica recente a partir de uma população simpátrica ancestral (HUNT *et al.*, 2008). Somente a população 1 (formada por linhagens oriunda do coral *M. decactis*) associada ao Habitat A (explicado unicamente pelas linhagens oriundas do coral *M. decactis*) teria divergido há um longo período evolutivo a partir da população ancestral.

Outo exemplo, pertencente ao gênero *Vibrio*, que possui duas populações que parecem estar divergindo recentemente é *V. cyclitrophicus*. Estas populações possuem um ciclo de vida diferenciado, pois durante os períodos desfavoráveis linhagens de *V. cyclitrophicus* são identificadas preferencialmente associadas a organismos maiores enquanto em condições ambientais favoráveis linhagens dessa espécie são encontradas vivendo livremente na coluna d'água (HUNT *et al.*, 2008, SHAPIRO *et al.*, 2012, SZABO *et al.*, 2012). Essas populações estão intimamente relacionadas apresentando 99% de similaridade quando suas sequências do gene

RNAr 16S são comparadas. Porém podem ser identificadas como duas populações distintas sob análise pelo software ADPTML. Quando comparados os genomas completos de representantes dessas duas populações, foram identificados 725 sítos de dimorfismo em nucleotídeos (SDN) que separavam essas duas populações, 80% dessas mutações estavam localizadas em 3 ilhas discretas no genoma (um total de 11 ilhas). Em contraste 28744 dos SDN estavam espalhados pelo restante do genoma demonstrando uma íntima relação entre essas duas populações (SHAPIRO *et al.*, 2012). Quando comparados filogeneticamente os genomas “core” e adaptativo apresentaram diferentes topologias que indicam maior taxa de transferência horizontal gênica no genoma adaptativo que no genoma “core”. O alto bootstrap (99.8) relacionado ao nodo divisor destes genomas também indicou que a recombinação ocorre principalmente intra-habitat. A aquisição de novos genes adaptativos e novos alelos pelo genoma “core” provavelmente iniciou a especialização em diferentes habitats ou hospedeiros o que reduziu a troca de genes entre as duas populações (SHAPIRO *et al.*, 2012). Quando analisada a presença ou ausência de 5 genes do genoma adaptativo foi verificado que a presença e ausência destes era similar em linhagens da mesma população porém diferia nas populações diferentes. Ou seja, mesmo entre linhagens intimamente relacionadas é possível identificar diferenças ecológicas refletidas no genoma (SZABO *et al.*, 2012).

Possivelmente no caso da formação da população 1, uma linhagem pertencente a população ancestral, teria adquirido uma ou mais características que a distinguiu. Essas modificações impediram que se mantivesse sob a mesma pressão seletiva que a população original, livrando essa diversidade de ser purgada nos eventos de seleção periódica (COHAN, 2001). Um exemplo é a aquisição de um locus que a permite a metabolização de um novo recurso. O novo genótipo e os descendentes portadores do mesmo formam um novo ecótipo, não mais susceptível aos eventos periódicos de seleção sofridos pelo ecótipo ancestral. A partir deste momento o novo ecótipo passa a ter sua própria história e pressões seletivas (COHAN, 2001). Durante esse processo de divergência que levou à formação da população 1, teria ocorrido uma associação com o coral *M. decactis*. A população 1 teria então sido submetida à nova pressão seletiva, que resultou na aquisição e perda de genes para melhor adaptação ao novo ambiente.

Levando em conta o grupo formado pelas populações 2, 3 e 4 encontramos um ancestral comum cujo habitat preferencial é a forma de vida livre e em associação com bivalves. Essa associação pode ser considerada forte, uma vez que dois dos ambientes preditos compartilham esta característica (Figura 11). Os grupos considerados de vida livre detectados são aqueles associados à coluna d'água, sedimento e ao plâncton marinhos. Foram identificados *V. shiloi* associados às seguintes espécies de bivalve: *C. gigas*, *C. corteziensis*, *R. philippinarum*, *M. edulis*, *O. edulis*, *Donax sp.* todos filtradores (MORTON, 1971, FOSTER-SMITH, 1975, KASAI *et al.*, 2004, TRABAL *et al.*, 2012). O hábito alimentar dos bivalves hospedeiros das linhagens analisadas explica a sua relação direta com as linhagens que possuem vida livre, visto que bactérias livres ou associadas a partículas na coluna d'água podem ser adquiridas diretamente durante a filtração. Porém não existem linhagens de *V. mediterranei/V. shiloi* oriundas de esponjas e/ou outros filtradores no GenBank. Portanto, os bivalves hospedeiros desse grupo, *v. mediterranei/V. shiloi*, podem adquirir-los por filtração mas deve haver outros fatores relacionados à sua associação.

A partir do habitat C que é explicado pela associação direta entre bivalves e linhagens de vida livre, surgiu a população 3 que ocuparia este habitat e a população 4 que ocuparia dois habitats diferentes. O primeiro habitat seria explicado principalmente pela associação com o poliqueta e os corais *M. hispida* e *O. patagonica*; o segundo principalmente pela associação com o bivalve *M. edulis*. No entanto esse segundo habitat da população 4 teria surgido mais recentemente a partir do habitat D (Figura 11) e deve ser considerado uma população, segundo as análises realizadas. Todas as linhagens que compõem a população 4 estão unidas por ramos rasos na construção filogenética (Figura 11). Essa característica indica uma divergência ou associação mais recente entre essas linhagens e o seu hospedeiro. Neste grupo encontramos a linhagem responsável pelo branqueamento de *O. patagonica* no Mar Mediterrâneo, e também encontramos linhagens associadas aos corais *M. hispida* saudáveis no litoral brasileiro (KUSHMARO *et al.*, 2001, CHIMETTO *et al.*, 2009).

A evolução das relações ecológicas entre as linhagens de *V. shiloi/V. mediterranei* pode ser explicada pelo modelo – Ecótipo Estável (FRASER *et al.*, 2009). Neste modelo uma célula bacteriana (pertencente a uma linhagem) se divide resultando em duas sublinhagens distintas

em algum aspecto de sua ecologia. Uma seleção periódica aconteceria e eliminaria quase toda a diversidade que poderia ter surgido desde o último evento. Como as duas populações formadas pelos descendentes destas sublinhagens seriam ecologicamente distintas (ecótipos) a seleção periódica de uma população não interferiria na diversidade da outra e vice-versa. Desta forma cada ecótipo poderia expandir sua diversidade ecológica através do acúmulo de mutações, da perda e aquisição de genes por transferência horizontal gênica e se tornar uma nova espécie (COHAN, 2001, FRASER *et al.*, 2009).

Apesar da diversidade de genótipos encontrada entre as linhagens estudadas, não podemos afirmar que os grupos formados (Populações 1 a 4) representam populações ou espécies nascentes. No entanto a maior parte das linhagens estudadas demonstraram ramos rasos nas análises filogenéticas enquanto as linhagens que compõem a população 1 apresentaram ramificações profundas que refletem a grande diferença na composição de nucleotídeos na sequência do gene *pyrH*. De acordo com as análises de HDD realizadas nesse estudo, as linhagens que compõem a população 1 pertencem a espécie *V. shiloi/V. mediterranei*, porém ao analisarmos a evolução ecológica, o habitat predito (A) para esta população e as sequências do gene *pyrH*, verificamos que as linhagens oriundas do coral *M. decactis* podem ser consideradas uma espécie nascente e não somente uma população. O sequenciamento de outros genes “house keeping” e a inclusão dos mesmos nas análises realizadas com o software ADAPTML podem contribuir para ampliar o entendimento da ecologia destes isolados (A-328, A-354 e A-384).

Nossas observações das diferentes distribuições de genótipos sugerem que há uma pequena escala adaptativa entre as linhagens proveniente das diferentes fontes de isolamento, o que pode estar refletindo o início de uma especiação, principalmente para a população 1 formada pelas linhagens oriundas do coral *M. decactis* (A-328, A-354 e A-384). Sendo assim, observamos a necessidade de refirmarmos a taxonomia das linhagens pertencentes a essa população.

## 5.2 Refinamento das análises taxonômicas das linhagens da População 1 (A-328, A-354 e A-384)

Para o refinamento da taxonomia a linhagem A-354 foi escolhida como a representante do grupo formado por esta e A-328 e A-384. A primeira etapa para a caracterização foi o sequenciamento do gene RNAr 16S completo. A análise filogenética resultante (Figura 13) apresentou um padrão similar aos apresentados pelas árvores filogenéticas do gene *pyrH* e do terço médio do gene em questão, favorecendo a possibilidade de representar um novo taxa.

A metodologia utilizada nesta dissertação para a aferição do conteúdo GC e de medição do  $\Delta T_m$ , ambos realizados em plataforma de RT-PCR, é considerada útil e simples em vista das técnicas tradicionais para a obtenção dos mesmos parâmetros (MOREIRA *et al.*, 2011). Neste estudo o conteúdo GC obtido pelas linhagens tipo foram equivalentes àqueles registrados na literatura (por HPLC), revelando a reprodutibilidade e acurácia da técnica empregada. Os conteúdos GC para a linhagem A-354 (44,03%) e para a A-203 (44,07%), apresentaram valores muito próximos e uma diferença (<1%) dentro da variação esperada para espécie. O conteúdo de GC da linhagem A-354 (44,03%) difere 1,4% em relação à *V. shiloi* AK1<sup>T</sup> e 1% em relação à *V. mediterranei* LMG11258<sup>T</sup>, em ambos os casos < 5%. Portanto a variação do conteúdo de GC das 3 linhagens está dentro do limite esperado para espécie.

Na análise de  $\Delta T_m$  das espécies- tipo (*V. shiloi* x *V. mediterranei*) era esperado a obtenção de valores acima de 5 °C (WAYNE *et al.*, 1987). Porém, o valor encontrado foi de 0,82 °C, indicando que estas são sinônima, conforme alegado por Thompson e colaboradores (THOMPSON *et al.*, 2001). O valor de HDD obtido para esse par foi de 72%. Considerando o erro associado à técnica de HDD (7%) (WILLEMS *et al.*, 2001), essa medida pode variar de 79% (mesma espécie) a 65% (espécies distintas). Ou seja, essas linhagens encontram-se na “Zona Cinza” (MOREIRA *et al.*, 2011), sendo difícil a resolução do seu posicionamento em nível de espécie. Segundo Kushmaro e colaboradores (KUSHMARO *et al.*, 2001), *V. shiloi* e *V. mediterranei* deveriam ser considerados duas espécies diferentes apesar da alta similaridade dos seus genomas, e o que as diferencia é a composição de ácidos graxos e a virulência demonstrada por *V. shiloi* AK1 contra *O. patagonica*, com satisfação dos postulados de Koch. No entanto para Thompson e colaboradores (THOMPSON *et al.*, 2001) *V. shiloi* é sinônima de *V.*

*mediterranei*, pois apresentam alta similaridade entre seus genomas, características fenotípicas idênticas, inclusive a composição de ácidos graxos, considerando que a virulência não é parâmetro taxonômico para discriminar duas espécies. Em uma mesma espécie de *Vibrio* podemos encontrar linhagens que possuem fatores de virulência, outras que não possuem e algumas que podem ser probióticas (VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Os valores encontrados de  $\Delta T_m$  para isolados foram abaixo do valor de corte de 5,0°C indicando assim que as linhagens A-203 e A-354, A-328 e A-384 não são espécie nova. O valor de  $\Delta T_m$  para o híbrido de A-203XA-354 foi de 0,68°C indicando que as duas linhagens são a mesma espécie. Os resultados sugerem que todos os isolados pertencem ao grupo *V. shiloi/V. mediterranei*. Os resultados de  $\Delta T_m$  obtidos para as linhagens tipo e aqueles obtidos para os isolados são concordantes entre si e com os dados de HDD reportados (KUSHMARO *et al.*, 2001, THOMPSON *et al.*, 2001). Também refletem a identidade das sequências do gene RNAr 16S (>97%).

O valor de similaridade das sequências parciais do gene *pyrH* <94% (> limite esperado para a mesma espécie) pode ter ocorrido devido a uma pressão seletiva diferenciada sobre esse gene no ambiente dos isolados (coral *M. decactis*). As modificações neste marcador podem não refletir a evolução do genoma inteiro. Isso é corroborado pelos resultados de HDD prévios e apresentados nesse estudo. As modificações resultantes dessa pressão seletiva diferenciada estariam refletidas nas análises populacionais realizadas com base nesse gene. Outras análises (ex: genômica e fenotípicas) poderão contribuir o entendimento da discrepância observada para a filogenia com base no marcador *pyrH*.

Devido a diversidade encontrada entre isolados do grupo *V. shiloi/V. mediterranei* e o agrupamentos das sequências geradas neste estudo em duas populações distintas e distantes evolutivamente, porém não tão distantes para serem consideradas duas espécies diferentes foram realizados bioensaios de patogenicidade envolvendo o organismo modelo artêmias

### **5.3 Ensaios de patogenicidade com isolados representativos do grupo *V. shiloi/V. mediterranei***

Considerando todas as linhagens que compõem o grupo *V. shiloi*/*V. mediterranei* descritas neste estudo e utilizadas na análise populacional (Figura 9, 10, 11 e 12), foram escolhidos representantes das duas populações formadas. Todas as linhagens da população 1 (A-328, A-354 e A-384) e três representantes da diversidade encontrada na população 4 (A-16, A-180 e A-203) foram utilizadas para os bioensaios de patogenicidade utilizando o organismo modelo artêmia. Diversos estudos foram publicados realizando teste de patogenicidade envolvendo este modelo e bactérias do gênero *Vibrio* (RICO-MORA and VOLTOLINA, 1995, VERSCHUERE *et al.*, 2000, AUSTIN *et al.*, 2005). Austin e colaboradores (AUSTIN *et al.*, 2005) realizaram bioensaios com uma linhagem denominada *V. shiloi* LMG 20977 (=AK2) e verificaram que esta apresenta baixa virulência. Porém a linhagem de referência utilizada, posteriormente, foi identificada como *V. harveyi*. Daí resulta que os resultados obtidos, referente ao potencial patogênico de linhagens de *V. shiloi* em artêmias, são inéditos.

Verificamos que algumas linhagens são capazes de provocar a mortalidade em artêmias (A-354 e A-384); outras não causam efeito algum na taxa de sobrevivência (A-16, A-180 e A-328) e uma (A-203) demonstrou uma capacidade probiótica, fazendo com que a taxa de sobrevivência fosse significativamente maior que o controle (Figura 15). Esse resultado indica uma plasticidade fenotípica entre os isolados de *V. shiloi*. A plasticidade dentre víbrios foi discutida por Vandenberghe e colaboradores (VANDENBERGHE *et al.*, 1999) quando observaram que algumas linhagens de *V. alginolyticus* estavam relacionadas (filogeneticamente) a linhagens patogênicas desta mesma espécie e à organismos doentes enquanto outras estavam mais relacionadas a uma linhagem probiótica e estavam associadas a organismos aparentemente saudáveis.

A fim de descobrir possíveis genes envolvidos na patogenicidade de isolados de *V. shiloi*/*V. mediterranei*, descritos nesse estudo, foi analisado o genoma completo de duas linhagens (A-203 e A-354) que influenciaram diferentemente a taxa de mortalidade de artêmias.

## **5.4 Análise dos genes de relacionados à virulência**

### **5.4.1 Genes relacionados à Fagos, Profagos, Elementos transposáveis e Plasmídeos**

#### **5.4.1.2 “Phage stress protein (Psp)”**

Na análise do genoma da linhagem A-354 foram encontrados genes ligados ao sistema de respostas a estresses extracitoplasmáticos “*Phage stress protein (Psp)*”, que responde à estresses gerados no envelope celular. A expressão do sistema *Psp* pode ser induzida por infecção provocada por fagos filamentosos, localização errada de certas proteínas que compõe o envelope, altas temperaturas, osmorregulação ou concentração de etanol e a formação de poros iônicos (MODEL *et al.*, 1997).

Os sistemas *Psp* de *Escherichia coli* e de *Yersinia enterocolitica* possuem em comum seis proteínas: A, B, C, D, F e G. Em um modelo proposto por Darwin e colaboradores (DARWIN, 2005), baseado em observações e algumas deduções: *PspA* se ligaria a *PspF* impedindo que este iniciasse sua atividade transcricional; *PspB* e/ou *PspC* que são proteínas da membrana interna possivelmente percebem uma condição que induz o funcionamento do sistema e interagem com o *PspA* fazendo com que este libere *PspF* que inicia a transcrição do operón *PspA* que recentemente foi identificado com *PspG*. Como consequência a concentração de *PspA* aumenta dramaticamente em relação a outras proteínas *Psp*, possuindo a função de reduzir a dissipação de *PspF*.

O gene *PspE*, que só está presente em *E. coli*, codifica proteínas periplásmicas e é transcrito tanto como parte do óperon quanto transcrito sozinho (BRISSETTE *et al.*, 1991, KLEEREBEZEM *et al.*, 1996). A proteína codificada pode estar relacionada com a formação ou reparo dos Centros de Ferro-Sulfuroso consequentemente envolvida no metabolismo de energia (ADAMS *et al.*, 2002). Os genes de *Psp* encontrados no genoma da linhagem A-354 foram *PspA*, *PspB*, *PspE* e o ativador transcricional do óperon, possivelmente o *PspF*, possuindo assim todos os genes necessários para o funcionamento desse sistema. A linhagem tipo AK1 possui os genes que codificam as proteínas *PspA*, *PspB*, *PspC*, *PspE* e também o ativador transcricional do óperon.

#### **5.4.1.3 Síntese e Replicação de DNA de Fagos**

Na análise do genoma das linhagens A-354 e AK1 foram encontrados genes relacionados com a síntese da subunidade alpha da DNA polimerase III e com a síntese de glutarredoxina. A glutarredoxina, também chamada de Transhidrogenase ou Thioltransferase, aumenta a

capacidade de redução da glutathionina, na reação da biosíntese dos desoxiribonucleotídeos, participando assim na formação dos precursores da síntese do DNA (HOLMGREN, 1981).

A glutaredoxina também foi descrita como importante para a propagação de bacteriófagos T4. Esta proteína, juntamente com a ribonucleotídeo redusase, dos T4, possuem a capacidade direcionar a maquinaria de síntese de DNA da bactéria hospedeira para a propagação de partículas virais (EKLUND *et al.*, 1992).

#### **5.4.1.4 Proteína de Capsídeo de Fago**

Na linhagem A-203 foi encontrado um gene relacionado ao capsídeo de Fagos do Gênero *Mu-like* e Família *Myoviridae*, classificado como fago com DNA dupla fita e cauda contrátil (BOYD and BRÜSSOW, 2002). Esse fago foi descrito em 2001 possuindo genes que codificam proteínas muito similares à proteínas associadas a membrana no envelope celular de bactérias *Neisseria meningitidis* sorotipo B. Devido a essa alta similaridade essas proteínas seriam expostas na superfície da bactéria hospedeira podendo modificar a resposta do hospedeiro à antígenos (MASIGNANI *et al.*, 2001).

#### **5.4.1.5 Elementos Transponíveis (ET)**

Na análise do genoma da linhagem A-203 foram encontrados genes relacionados à proteínas que se ligam ao ATP, DNA invertases, Transposases (TniA e “*helper protein*”), Endonucleases (Família TnsA) e ATPases. Todos estes genes estariam relacionados ao subsistema CBSS-203122.12.peg.188 dentro da classificação Elementos Transponíveis (ET). ETs são sequências de DNA que possuem a capacidade de mudar de sítio dentro de um genoma. Esses elementos podem codificar enzimas para o seu próprio movimento ou depender de elementos codificados por outros ETs. Um determinado genoma pode ter poucos ETs ou em alguns casos os ETs podem representar a maior parte do genoma, podendo assim ter um papel crucial na evolução das espécies (KIDWELL and LISCH, 2001).

#### 5.4.2 Genes ligados à Aquisição e Metabolismo de Ferro

Na natureza o ferro livre é predominantemente indisponível para procariotos, ocorrendo principalmente em agregados polinucleares insolúveis ou associado a complexos proteicos em fluidos e tecidos animais (WILLIAMS, 1979). No entanto, este elemento é essencial para o crescimento de quase todas as bactérias. Por isso os organismos desenvolveram uma série de mecanismos para a aquisição de ferro do ambiente. Dentre esses mecanismos podemos citar a síntese de sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular, com alta afinidade por ferro. Os sideróforos solubilizam o ferro ligados à estruturas complexas, competem com os mecanismos de aquisição de ferro dos hospedeiros (ex: transferrinas e lactoferrinas) e mobilizam o ferro para o uso bacteriano (LITWIN and CALDERWOOD, 1993). Devido a essa regulação na aquisição de ferro, a síntese de sideróforos vem sendo relacionada diretamente à virulência, influenciando a expressão de genes ligados à fatores de virulência (LITWIN and CALDERWOOD, 1993).

Sideróforos detectados em *Vibrios* patogênicos demonstram uma grande variedade de estruturas, porém normalmente cada espécie de *Vibrio* produz somente um tipo de Sideróforo. *V. cholerae*, *V. fluvialis* e *V. vulnificus* produzem sideróforos do tipo Catecolados; *V. anguillarum* produz um sideróforo específico, que possui dois grupos funcionais: Catecolado e Hidroxamato; *V. mimicus* e *V. hollisae* produzem um sideróforo aerobactina do tipo Hidroxamado, que é encontrado principalmente em espécies da Família *Enterobacteriaceae*; e *V. parahemoliticus* e *V. anguillarum* produzem o Sideróforo Vibrioferrina que é classificado como citrato-polihidroxicarboxilato baseado (FUNAHASHI *et al.*, 2002).

Na análise do genoma da linhagem A-354 foram encontrados genes relacionados a produção e transporte de dois sideróforos (Aerobactina e Vibrioferrina) ao contrário do que é descrito para a maioria das espécies de *Vibrio*. Nesta linhagem também foram encontrados genes ligados à montagem do sideróforo Aerobactina e sistemas de aquisição, utilização e transporte de Heme, típicos de bactéria Gram-negativas. Na linhagem A-203 foram encontrados genes relacionados à síntese, transporte e recepção do sideróforo Aerobactina.

### **5.4.3 Genes ligados à Virulência, Doença e Defesa: Bacteriomicinas, Peptídeos Antibacterianos Sintetizados por Ribossomos**

A produção de substâncias antibióticas é comum para a maioria das espécies de bactérias. Uma classe importante de antibióticos é a Bacteriomicina, que possui um série de aplicações industriais, incluindo preservação de alimentos e produção de antibióticos. As bacteriomicinas possuem um papel importante nas relações de competição entre bactérias, sendo produzidas para a inibição ou morte de linhagens ou espécies intimamente relacionadas. Dentre as bacteriomicinas podemos citar as Halocinas, Pilocinas, Colicinas, Cloacinas, Klebicinas e Marcescinas, sendo que as cinco últimas parecem compartilhar um mesmo ancestral devido a similaridade das sequências das proteínas (RILEY, 1998).

As bacteriomicinas entram nas células alvo reconhecendo receptores na superfície celular e matam as células principalmete por três processos: formação de canais íon-permeáveis na membrana citoplasmática, degradação não específica do DNA, inibição da síntese protéica pela clivagem do RNAr 16S ou pela lise celular resultante da inibição da síntese de peptídeoglicanos. As linhagens que produzem bacteriomicinas normalmente apresentam uma imunidade ao seu próprio antibiótico.

As bacteriomicinas, geralmente, são produzidas por um grupo de três genes plasmídeo-codificados: um gene responsável pela síntese de bacteriomicina, outro relacionado a imunidade e por fim um relacionado a lise celular. As células alvo podem adquirir resitência ou tolerância principalmente através da alteração do receptor da membrana ao qual a bacteriomicina se liga ou pela alteração das proteínas de membrana que fazem parte do sistema de translocação (PUGSLEY, 1984, PUGSLEY and OUDEGA, 1987, RILEY, 1998).

#### **5.4.3.1 Colicina V**

A colicina V é sintetizada por genes localizados no plasmídeo ColV, que é responsável pela codificação de diferentes genes associados a virulência (LITWIN and CALDERWOOD, 1993). Aparentemente além do gene que codifica a Colicina V, esses plasmídeos carregam genes que codificam a síntese do sideróforo Aerobactina. A Colicina V, ao contrário da maior parte das colicinas não é liberada extracelularmente por lise celular, mas é transportada para fora da

célula. Esta proteína ataca as células alvo destruindo o potencial da membrana interna do envelope celular (WATERS and CROSA, 1991).

Na análise do genoma da linhagem A-203 foram encontrados genes responsáveis pela produção e exportação da proteína Colicina V, assim como genes ligados a síntese de Aerobactina, sugerindo que esta linhagem possua o Plasmídeo V (ColV). A presença desse plasmídeo em linhagens de *Escherichia coli* está associada ao aumento da capacidade de sobrevivência e proliferação da bactéria nos tecidos e fluídos do corpo do animal infectado (WILLIAMS and WARNER, 1980).

#### **5.4.3.2 Colicina E2**

A Colicina E2 é sintetizada por gene localizados no plasmídeo ColE2. A Colicina E2 causa a destruição e solubilização não específica do DNA da célula alvo (HERSCHMAN and HELINSKI, 1967). A liberação dessa proteína ocorre de forma similar a Colicina V, por transportadores inseridos na membrana (PUGSLEY and SCHWARTZ, 1984). Na análise do genoma da linhagem A-354 foi encontrado um gene ligado a resistência a Colicina E2. Essa função também foi encontrada na linhagem tipo AK1.

Análises taxonômicas e ecológicas são complementares. A definição de espécie é pragmática e leva em consideração parâmetros objetivos, como limites de corte para dados experimentais (HDD, delta Tm), sendo universal, útil e preditiva. Os conceitos de espécie, incluindo ecótipo, levam em consideração a origem dos organismos e outros parâmetros, sendo úteis para a integração da complexidade associada aos organismos, como sua ecologia e evolução. Portanto, em dado momento evolutivo, uma dada espécie pode ser claramente relacionada a um dado ecótipo e vice-versa, porém isso pode não ocorrer durante todo o processo evolutivo.

## 6. CONCLUSÕES

1. Possivelmente as linhagens A-354, A-384 e A-328 estariam sofrendo o processo de especiação mas seus genomas ainda não apresentam diferenças suficientes para que os valores de corte definidos pelas análises por  $\Delta T_m$  e HDD para a delimitação de espécies, sejam ultrapassados;
2. A população formada pelas linhagens associadas ao poliqueta e aos corais e a linhagem tipo de *V. shiloi* possui ramos curtos e rasos indicando uma recente diversificação e/ou recente associação entre a bactéria e esses hospedeiros. Esta população possivelmente divergiu de uma população ancestral com hábito de vida livre.
3. Os genomas dos isolados 203 e 354 apresentaram tipos diferentes de genes de virulência, podendo assim ter respostas diferentes em condições ambientais diversas.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Complementar o estudo dos genomas de *V. shiloi*, realizando novas análises fenotípicas e metabólicas com a linhagem A-354 com finalidade taxonômica.
2. Confirmar e ampliar os testes de patogenicidade utilizando corais como organismos-modelo, ao invés das artêmias, utilizando as linhagens A-203, A-354 e A-384. Alguns experimentos pilotos já foram realizados envolvendo o efeito do aumento de temperatura nos corais *M. hispida*, coletados em Arraial do Cabo. Os corais foram aclimatados em nosso sistema de aquários à uma temperatura de 24°C. A temperatura foi aumentada de 24°C para 29°C e foi verificado um branqueamento seguido de necrose tecidual (Figura 16). Foi feito o isolamento, triagem e

conservação de isolados utilizando os meios ágar marinho e TCBS a fim de realizar uma futura identificação taxonômica das espécies bacterianas presentes neste momento de adoecimento dos corais. Foram isolados um total de 192 linhagens, ainda não identificadas.



**Figura 16 - Coral sofrendo necrose tecidual após dois dias à uma temperatura dois graus acima da temperatura de aclimação (24°C).**

- 3 Utilização destas linhagens para ensaio de patogenicidade em zooxantelas em microplacas. Alguns experimentos pilotos já foram realizados porém ainda é necessário a sua padronização.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, H., TEERTSTRA, W., KOSTER, M., and TOMMASSEN, J. 2002. PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology letters **518**:173-176.

AINSWORTH, T., FINE, M., ROFF, G., and HOEGH-GULDBERG, O. 2008. Bacteria are not the primary cause of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagonica*. International Society for Microbial Ecology Journal **2**:67-73.

ALBERT, M., ANSARUZZAMAN, M., BARDHAN, P., FARUQUE, A., FARUQUE, S., ISLAM, M., MAHALANABIS, D., SACK, R., SALAM, M., and SIDDIQUE, A. 1993. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal. The Lancet **342**:387-390.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., and LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research **25**:3389-3402.

ALVES JR, N., NETO, O. S. M., SILVA, B. S. O., DE MOURA, R. L., FRANCINI-FILHO, R. B., BARREIRA E CASTRO, C., PARANHOS, R., BITNER-MATHÉ, B. C., KRUGER, R. H., VICENTE, A. C. P., THOMPSON, C. C., and THOMPSON, F. L. 2010. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. Environmental Microbiology Reports **2**:90-95.

AMARAL, F. D., HUDSON, M. M., SILVEIRA, F. L., MIGOTTO, A. E., PINTO, S. M., and LONGO, L. 2002. Cnidarians of Saint Peter and St. Paul Archipelago, Northeast Brazil. Pages 567-572.

ARRAIS, R. P. A. 2012. O nascimento de um arquipélago: São Pedro e São Paulo ea presença do Estado brasileiro no Oceano Atlântico. Revista Porto **1**:44-69.

AUSTIN, B., AUSTIN, D., SUTHERLAND, R., THOMPSON, F., and SWINGS, J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. Environmental Microbiology **7**:1488-1495.

BANIN, E., BEN-HAIM, Y., FINE, M., ISRAELY, T., and ROSENBERG, E. 2002. Virulence mechanisms of the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. Pages 1261-1266 in Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium, Bali, 23-27 October 2000.

BANIN, E., ISRAELY, T., KUSHMARO, A., LOYA, Y., ORR, E., and ROSENBERG, E. 2000. Penetration of the Coral-Bleaching Bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:3031-3036.

BANIN, E., KHARE, S. K., NAIDER, F., and ROSENBERG, E. 2001. Proline-Rich Peptide from the Coral Pathogen *Vibrio shiloi* That Inhibits Photosynthesis of Zooxanthellae. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:1536-1541.

BANIN, E., VASSILAKOS, D., ORR, E., MARTINEZ, R. J., and ROSENBERG, E. 2003. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current microbiology* **46**:418-422.

BEAZ-HIDALGO, R., BALBOA, S., ROMALDE, J. L., and FIGUERAS, M. J. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* **2**:34-43.

BEN-HAIM, Y. B.-H. and ROSENBERG, E. R. 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* **141**:47-55.

BENCKE, G. A., OTT, P., MORENO, I., TAVARES, M., and CAON, G. 2005. Old World birds new to the Brazilian territory recorded in the Archipelago of São Pedro and São Paulo, equatorial Atlantic Ocean. *Ararajuba* **13**:126-129.

BINDOFF, N., J.WILLEBRAND,V.ARTALE,A. CAZENAVE, J.GREGORY, S.GULEV,K.HANAWA, C. LEQUÉRE AND CO-AUTHORS. 2007. Observations:Oceanic climate change and sea level. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt,M. Tignor and H.L.Miller,. Eds. Cambridge University Press, Cambridge.

BOURNE, D. G., GARREN, M., WORK, T. M., ROSENBERG, E., SMITH, G. W., and HARVELL, C. D. 2009. Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in microbiology* **17**:554-562.

BOYD, E. F. and BRÜSSOW, H. 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends in microbiology* **10**:521-529.

BRISSETTE, J. L., WEINER, L., RIPMASTER, T. L., and MODEL, P. 1991. Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of molecular biology* **220**:35-48.

BURGOS, D. C., PEREIRA, S. M. B., and BANDEIRA-PEDROSA, M. E. 2009. Levantamento florístico das rodofíceas do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP)–Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **23**:1110-1118.

CAMPOS, T. F. D. C. 2004. Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Departamento de Geologia da Universidade Federal do Rio grande do Norte.

CASAGRANDE, B., CRUZ, D. O., and DE ALVAREZ, C. E. 2003. Estação Científica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo: em busca da sustentabilidade.

CHIMETTO, L. A., BROCCHI, M., GONDO, M., THOMPSON, C. C., GOMEZ-GIL, B., and THOMPSON, F. L. 2009. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). *Journal of applied microbiology* **106**:1818-1826.

CHIMETTO, L. A., BROCCHI, M., THOMPSON, C. C., MARTINS, R. C. R., RAMOS, H. R., and THOMPSON, F. L. 2008. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and applied microbiology* **31**:312-319.

CHIMETTO, L. A., CLEENWERCK, I., MOREIRA, A. P. B., BROCCHI, M., WILLEMS, A., DE VOS, P., and THOMPSON, F. L. 2011. *Vibrio variabilis* sp. nov. and *Vibrio maritimus* sp. nov., isolated from *Palythoa caribaeorum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **61**:3009-3015.

COHAN, F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology* **50**:513-524.

COHAN, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annual Reviews in Microbiology* **56**:457-487.

COLEMAN, M. L. and CHISHOLM, S. W. 2010. Ecosystem-specific selection pressures revealed through comparative population genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:18634-18639.

COLWELL, R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of bacteriology* **104**:410-433.

COPPER, P. 1994. Ancient reef ecosystem expansion and collapse. *Coral Reefs* **13**:3-11.

COSTANZA, R., DARGE, R., DEGROOT, R., FARBER, S., GRASSO, M., HANNON, B., LIMBURG, K., NAEEM, S., ONEILL, R. V., PARUELO, J., RASKIN, R. G., SUTTON, P., and VANDENBELT, M. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**:260.

DANIELS, N. A., MACKINNON, L., BISHOP, R., ALTEKRUSE, S., RAY, B., HAMMOND, R. M., THOMPSON, S., WILSON, S., BEAN, N. H., and GRIFFIN, P. M. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *Journal of Infectious Diseases* **181**:1661-1666.

DARWIN, A. J. 2005. The phage-shock-protein response. *Molecular microbiology* **57**:621-628.

DEFOIRDT, T., BOSSIER, P., SORGELOOS, P., and VERSTRAETE, W. 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology* **7**:1239-1247.

DINSDALE, E. A., EDWARDS, R. A., HALL, D., ANGLY, F., BREITBART, M., BRULC, J. M., FURLAN, M., DESNUES, C., HAYNES, M., LI, L., MCDANIEL, L., MORAN, M. A., NELSON, K. E., NILSSON, C., OLSON, R., PAUL, J., BRITO, B. R., RUAN, Y., SWAN, B. K., STEVENS, R., VALENTINE, D. L., THURBER, R. V., WEGLEY, L., WHITE, B. A., and ROHWER, F. 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**:629-632.

DOUGLAS, A. E. 2003. Coral bleaching--how and why? *Marine Pollution Bulletin* **46**:385-392.

DUCKLOW, H. W. and MITCHELL, R. 1979. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnology Oceanography (United States)* **24**.

DUNN, S. R., BYTHELL, J. C., LE TISSIER, M. D., BURNETT, W. J., and THOMASON, J. C. 2002. Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia sp.* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **272**:29-53.

EDWARDS, A. and LUBBOCK, R. 1983. The ecology of Saint Paul's Rocks (Equatorial Atlantic). *Journal of zoology* **200**:51-69.

EILERS, H., PERNTHALER, J., and AMANN, R. 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4634-4640.

EKLUND, H., INGELMAN, M., SÖDERBERG, B.-O., UHLIN, T., NORDLUND, P., NIKKOLA, M., SONNERSTAM, U., JOELSON, T., and PETRATOS, K. 1992. Structure of oxidized bacteriophage T4 glutaredoxin (thioredoxin): refinement of native and mutant proteins. *Journal of molecular biology* **228**:596-618.

ESPIÑEIRA, M., ATANASSOVA, M., VIEITES, J. M., and SANTA CLARA, F. J. 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food microbiology* **27**:122-131.

EUZEBY, J. P. 2013. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPNS.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*:783-791.

FOSTER-SMITH, R. 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **17**:1-22.

FRASER, C., ALM, E. J., POLZ, M. F., SPRATT, B. G., and HANAGE, W. P. 2009. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* **323**:741-746.

FRASER, C., HANAGE, W. P., and SPRATT, B. G. 2007. Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science* **315**:476-480.

FUNAHASHI, T., MORIYA, K., UEMURA, S., MIYOSHI, S.-I., SHINODA, S., NARIMATSU, S., and YAMAMOTO, S. 2002. Identification and characterization of pvuA, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* **184**:936-946.

GATES, R. D., HOEGH-GULDBERG, O., MCFALL-NGAI, M. J., BIL, K. Y., and MUSCATINE, L. 1995. Free amino acids exhibit anthozoan "host factor" activity: They induce the release of

photosynthate from symbiotic dinoflagellates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:7430-7434.

GENBANK. 2012. GenBank Overview. NCBI - National Center for Biotechnology Information.

GODINOT, C., HOULBRÈQUE, F., GROVER, R., and FERRIER-PAGÈS, C. 2011. Coral Uptake of Inorganic Phosphorus and Nitrogen Negatively Affected by Simultaneous Changes in Temperature and pH. *PLoS ONE* **6**:e25024.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., CHIMETTO, L., MOREIRA, A. P. B., LANG, E., and THOMPSON, F. L. 2012. *Vibrio alfacensis* sp. nov., isolated from marine organisms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**:2955-2961.

GOMEZ-GIL, B., SOTO-RODRIGUEZ, S., GARCÍA-GASCA, A., ROQUE, A., VAZQUEZ-JUAREZ, R., THOMPSON, F. L., and SWINGS, J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* **150**:1769-1777.

GONZALEZ, J. and SAIZ-JIMENEZ, C. 2002. A fluorimetric method for the estimation of G+ C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environmental Microbiology* **4**:770-773.

GONZALEZ, J. M. and SAIZ-JIMENEZ, C. 2005. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles* **9**:75-79.

GRANT, A., RÉMOND, M., PEOPLE, J., and HINDE, R. 1997. Effects of host-tissue homogenate of the scleractinian coral *Plesiastrea versipora* on glycerol metabolism in isolated symbiotic dinoflagellates. *Marine Biology* **128**:665-670.

HAAPKYLÄ, J., UNSWORTH, R. K. F., FLAVELL, M., BOURNE, D. G., SCHAFFELKE, B., and WILLIS, B. L. 2011. Seasonal Rainfall and Runoff Promote Coral Disease on an Inshore Reef. *PLoS ONE* **6**:e16893.

HERSCHMAN, H. R. and HELINSKI, D. R. 1967. Purification and characterization of colicin E2 and colicin E3. *Journal of Biological Chemistry* **242**:5360-5368.

HOEGH-GULDBERG, O., MUMBY, P. J., HOOTEN, A. J., STENECK, R. S., GREENFIELD, P., GOMEZ, E., HARVELL, C. D., SALE, P. F., EDWARDS, A. J., CALDEIRA, K., KNOWLTON, N., EAKIN, C. M.,

IGLESIAS-PRIETO, R., MUTHIGA, N., BRADBURY, R. H., DUBI, A., and HATZIOLOS, M. E. 2007. Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* **318**:1737-1742.

HOFFMANN, M., FISCHER, M., OTTESEN, A., MCCARTHY, P. J., LOPEZ, J. V., BROWN, E. W., and MONDAY, S. R. 2010. Population dynamics of *Vibrio* spp. associated with marine sponge microcosms. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **4**:1608-1612.

HOLMGREN, A. 1981. Regulation of ribonucleotide reductase. *Current topics in cellular regulation* **19**:47.

HUNT, D. E., DAVID, L. A., GEVERS, D., PREHEIM, S. P., ALM, E. J., and POLZ, M. F. 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* **320**:1081-1085.

ISRAELY, T., BANIN, E., and ROSENBERG, E. 2001. Growth, differentiation and death of *Vibrio shiloi* in coral tissue as a function of seawater temperature. *Aquatic Microbial Ecology* **24**:1-8.

JONES, R. J., HOEGH-GULDBERG, O., LARKUM, A. W. D., and SCHREIBER, U. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell & Environment* **21**:1219-1230.

KASAI, A., HORIE, H., and SAKAMOTO, W. 2004. Selection of food sources by *Ruditapes philippinarum* and *Macra veneriformis* (Bivalva: Mollusca) determined from stable isotope analysis. *Fisheries science* **70**:11-20.

KELMAN, D., KASHMAN, Y., ROSENBERG, E., KUSHMARO, A., and LOYA, Y. 2006. Antimicrobial activity of Red Sea corals. *Marine Biology* **149**:357-363.

KIDWELL, M. G. and LISCH, D. R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* **55**:1-24.

KLEEREBEZEM, M., CRIELAARD, W., and TOMMASSEN, J. 1996. Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *The EMBO journal* **15**:162.

KLEYPAS, J. A., BUDDEMEIER, R. W., ARCHER, D., GATTUSO, J. P., LANGDON, C., and OPDYKE, B. N. 1999. Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. *Science* **284**:118-120.

KOOPERMAN, N., BEN-DOV, E., KRAMARSKY-WINTER, E., BARAK, Z., and KUSHMARO, A. 2007. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. *FEMS microbiology letters* **276**:106-113.

KUSHMARO, A., BANIN, E., LOYA, Y., STACKEBRANDT, E., and ROSENBERG, E. 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**:1383-1388.

KUSHMARO, A., LOYA, Y., FINE, M., and ROSENBERG, E. 1996. Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* **380**:396.

KUSHMARO, A., ROSENBERG, E., FINE, M., HAIM, Y. B., and LOYA, Y. 1998. Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* **171**:131-137.

KUSHMARO, A., ROSENBERG, E., FINE, M., and LOYA, Y. 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine ecology progress series*. Oldendorf **147**:159-165.

KVENNEFORS, E. C. E., SAMPAYO, E., KERR, C., VIEIRA, G., ROFF, G., and BARNES, A. C. 2012. Regulation of Bacterial Communities Through Antimicrobial Activity by the Coral Holobiont. *Microbial ecology*:1-14.

LAFFERTY, K. D. and HOLT, R. D. 2003. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecology Letters* **6**:654-664.

LESSER, M. P., MAZEL, C. H., GORBUNOV, M. Y., and FALKOWSKI, P. G. 2004. Discovery of Symbiotic Nitrogen-Fixing Cyanobacteria in Corals. *Science* **305**:997-1000.

LEY, J. D., CATTOIR, H., and REYNAERTS, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* **12**:133-142.

LIBRADO, P. A. R., J. 2009. Dna SP v.5.1: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.

LIGHTNER, D. and REDMAN, R. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**:201-220.

LITWIN, C. M. and CALDERWOOD, S. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews* **6**:137-149.

LUBBOCK, R. and EDWARDS, A. 1981. The fishes of Saint Paul's rocks. *Journal of Fish Biology* **18**:135-157.

MASIGNANI, V., GIULIANI, M. M., TETTELIN, H., COMANDUCCI, M., RAPPUOLI, R., and SCARLATO, V. 2001. Mu-like Prophage in serogroup B *Neisseria meningitidis* coding for surface-exposed antigens. *Infection and immunity* **69**:2580-2588.

MEGLITSCH, P. A. 1954. On the nature of the species. *Systematic Biology* **3**:49-65.

MOBERG, F. and FOLKE, C. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological economics* **29**:215-233.

MODEL, P., JOVANOVIĆ, G., and DWORKIN, J. 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Molecular microbiology* **24**:255-261.

MOREIRA, A. P. B., CHIMETTO, L. T., PEREIRA, C. V. P., ALVES JR, N., NASCIMENTO, J., CONI, E. C. O., AMADO-FILHO, G. M., FRANCINI-FILHO, R. B., and THOMPSON, F. L. 2013. Culturable heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached *Madracis decactis* and the fireworm *Hermodice carunculata* from the remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. *Current microbiology*, Accepted in July 2013.

MOREIRA, A. P. B., PEREIRA, N., and THOMPSON, F. L. 2011. Usefulness of a real-time PCR platform for G+C content and DNA–DNA hybridization estimations in vibrios. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **61**:2379-2383.

MORTIMER, E. and VAN VUUREN, B. J. 2007. Phylogeography of *Eupodes minutus* (Acari: Prostigmata) on sub-Antarctic Marion Island reflects the impact of historical events. *Polar Biology* **30**:471-476.

MORTON, B. 1971. The diurnal rhythm and tidal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **3**:329-342.

MOURA, C. 2006. Coral Reefs and the Global Network of Marine Protect Areas. *Science* **1125295**:312.

MUSCATINE, L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science* (New York, NY) **156**:516.

MUSCATINE, L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. Z. Dubinsky, ed. Elsevier, Amsterdã.

NCBI. 2013. National Center for Biotechnology Information.

OLIVER, J. D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells. Pages 239–272 *in* I. S. Kjelleberg, editor. *Starvation in bacteria*. Plenum Press, New York, NY.

PALYS, T., NAKAMURA, L., and COHAN, F. M. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**:1145-1156.

PARRY, M. L., CANZIANI, O. F., PALUTIKOF, J. P., VAN DER LINDEN, P. J., and HANSON, C. E. 2007. *Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability*.

PASCUAL, J., MACIÁN, M. C., ARAHAL, D. R., GARAY, E., and PUJALTE, M. J. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**:154-165.

PITCHER, D., SAUNDERS, N., and OWEN, R. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**:151-156.

POLZIN, T., DANESHMAND, S. V. 2004. Network 4.6.1.1: Fluxus Technology Ltd Steiner (MP) algorithm.

PUGSLEY, A. 1984. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiological sciences* **1**:168-175.

PUGSLEY, A. and OUDEGA, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmids. .105-161.

PUGSLEY, A. P. and SCHWARTZ, M. 1984. Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *The EMBO journal* **3**:2393.

RAINA, J.-B., TAPIOLAS, D., WILLIS, B. L., and BOURNE, D. G. 2009. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:3492-3501.

RESHEF, L., KOREN, O., LOYA, Y., ZILBER-ROSENBERG, I., and ROSENBERG, E. 2006. The Coral Probiotic Hypothesis. *Environmental Microbiology* **8**:2068-2073.

RETCHLESS, A. C. and LAWRENCE, J. G. 2007. Temporal fragmentation of speciation in bacteria. *Science* **317**:1093-1096.

RICO-MORA, R. and VOLTOLINA, D. 1995. Effects of Bacterial Isolates from *Skeletonema costatum* Cultures on the Survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of invertebrate pathology* **66**:203-204.

RILEY, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual review of genetics* **32**:255-278.

RITCHIE, K. B. 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* **322**:1-14.

RITCHIE, K. B. and SMITH, G. W. 2004. Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. Pages 259-264. Springer Verlag.

ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R., and ZILBER-ROSENBERG, I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Micro* **5**:355-362.

ROSENBERG, E., KUSHMARO, A., KRAMARSKY-WINTER, E., BANIN, E., and YOSSI, L. 2008. The role of microorganisms in coral bleaching. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* **3**:139-146.

ROSSELLÓ-MORA, R. and AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* **25**:39-67.

SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**:406-425.

SAWABE, T., KITA-TSUKAMOTO, K., and THOMPSON, F. L. 2007. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of bacteriology* **189**:7932-7936.

SAWYER, S. J. and MUSCATINE, L. 2001. Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Journal of Experimental Biology* **204**:3443-3456.

SEBENS, K. P. 1994. Biodiversity of Coral Reefs: What are We Losing and Why? *American Zoologist* **34**:115-133.

SHAPIRO, B. J., FRIEDMAN, J., CORDERO, O. X., PREHEIM, S. P., TIMBERLAKE, S. C., SZABÓ, G., POLZ, M. F., and ALM, E. J. 2012. Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* **336**:48-51.

SILVA, B. S. D. O. 2012. Diversidade genômica de bacterioplâncton mixotrófico do banco de abrolhos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SMALL, C. and NICHOLLS, R. J. 2003. A global analysis of human settlement in coastal zones. *Journal of Coastal Research* **19**:584-599.

SMITH, D. J., SUGGETT, D. J., and BAKER, N. R. 2005. Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology* **11**:1-11.

SMITH, S. 1978. Coral-reef area and the contributions of reefs to processes and resources of the world's oceans. *Nature* **273**:225-226.

SOTO-RODRIGUEZ, S., ROQUE, A., LIZARRAGA-PARTIDA, M., GUERRA-FLORES, A., and GOMEZ-GIL, B. 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms* **53**:231-240.

SPALDING, M. and GRENFELL, A. 1997. New estimates of global and regional coral reef areas. *Coral Reefs* **16**:225-230.

STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G. M., GRIMONT, P. A., KÄMPFER, P., MAIDEN, M. C., NESME, X., ROSSELLÓ-MORA, R., SWINGS, J., and TRÜPER, H. G. 2002. Report of the ad

hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**:1043-1047.

STACKEBRANDT, E. and GOEBEL, B. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:846-849.

SUSSMAN, M., LOYA, Y., FINE, M., and ROSENBERG, E. 2003. The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology* **5**:250-255.

SUSSMAN, M., WILLIS, B. L., VICTOR, S., and BOURNE, D. G. 2008. Coral Pathogens Identified for White Syndrome (WS) Epizootics in the Indo-Pacific. *PLoS ONE* **3**:e2393.

SUTTON, D. and HOEGH-GULDBERG, O. 1990. Host-zooxanthella interactions in four temperate marine invertebrate symbioses: assessment of effect of host extracts on symbionts. *The Biological Bulletin* **178**:175-186.

SZABO, G., PREHEIM, S. P., KAUFFMAN, K. M., DAVID, L. A., SHAPIRO, J., ALM, E. J., and POLZ, M. F. 2012. Reproducibility of Vibrionaceae population structure in coastal bacterioplankton. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* **7**:509-519.

THOMPSON, C., VICENTE, A., SOUZA, R., VASCONCELOS, A., VESTH, T., ALVES, N., USSERY, D., IIDA, T., and THOMPSON, F. 2009. Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evolutionary Biology* **9**:258.

THOMPSON, F., GEVERS, D., THOMPSON, C., DAWYNDT, P., NASER, S., HOSTE, B., MUNN, C., and SWINGS, J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:5107.

THOMPSON, F., THOMPSON, C., NASER, S., HOSTE, B., VANDEMEULEBROECKE, K., MUNN, C., BOURNE, D., and SWINGS, J. 2005. *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**:913-917.

THOMPSON, F. L., GOMEZ-GIL, B., VASCONCELOS, A. T. R., and SAWABE, T. 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4279-4285.

THOMPSON, F. L., HOSTE, B., THOMPSON, C. C., HUYS, G., and SWINGS, J. 2001. The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. *Systematic and applied microbiology* **24**:516-519.

THOMPSON, F. L., HOSTE, B., VANDEMEULEBROECKE, K., and SWINGS, J. 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and applied microbiology* **24**:520-538.

THOMPSON, F. L., IIDA, T., and SWINGS, J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews* **68**:403-431.

THOMPSON, F. L., THOMPSON, C. C., VICENTE, A. C., THEOPHILO, G. N., HOFER, E., and SWINGS, J. 2003. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology* **41**:1946-1950.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**:4673-4680.

THURBER, R. V., WILLNER-HALL, D., RODRIGUEZ-MUELLER, B., DESNUES, C., EDWARDS, R. A., ANGLY, F., DINSDALE, E., KELLY, L., and ROHWER, F. 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environmental Microbiology* **11**:2148-2163.

TORANZO, A. E., MAGARIÑOS, B., and ROMALDE, J. L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**:37-61.

TOREN, A., LANDAU, L., KUSHMARO, A., LOYA, Y., and ROSENBERG, E. 1998. Effect of Temperature on Adhesion of *Vibrio* Strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on Coral Bleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1379-1384.

TOURAKI, M., KARAMANLIDOU, G., KOZIOTIS, M., and CHRISTIDIS, I. 2013. Antibacterial effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on *Artemia franciscana* nauplii and *Dicentrarchus labrax* larvae against the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture International*:1-15.

TRABAL, N., MAZÓN-SUÁSTEGUI, J. M., VÁZQUEZ-JUÁREZ, R., ASENCIO-VALLE, F., MORALES-BOJÓRQUEZ, E., and ROMERO, J. 2012. Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated

with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. *Microbial ecology* **64**:555-569.

VAN VALEN, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*:233-239.

VANDENBERGHE, J., VERDONCK, L., ROBLES-AROZARENA, R., RIVERA, G., BOLLAND, A., BALLADARES, M., GOMEZ-GIL, B., CALDERON, J., SORGELOOS, P., and SWINGS, J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2592-2597.

VASKE, T., LESSA, R. P., DE NÓBREGA, M., MONTEALEGRE-QUIJANO, S., MARCANTE SANTANA, F., and BEZERRA, J. L. 2005. A checklist of fishes from Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology* **21**:75-79.

VELTHUYS, B. 1980. Mechanisms of electron flow in photosystem II and toward photosystem I. *Annual Review of Plant Physiology* **31**:545-567.

VERSCHUERE, L., HEANG, H., CRIEL, G., SORGELOOS, P., and VERSTRAETE, W. 2000. Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1139-1146.

VOS, M. 2011. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends in microbiology* **19**:1-7.

WARNER, M. W., CHILCOAT, G. C., MCFARLAND, F. M., and FITT, W. F. 2002. Seasonal fluctuations in the photosynthetic capacity of photosystem II in symbiotic dinoflagellates in the Caribbean reef-building coral *Montastraea* sp. *Marine Biology* **141**:31-38.

WATERS, V. L. and CROSA, J. H. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiological reviews* **55**:437-450.

WAYNE, L., BRENNER, D., COLWELL, R., GRIMONT, P., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M., MOORE, L., MOORE, W., MURRAY, R., and STACKEBRANDT, E. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:463-464.

WIEDENBECK, J. and COHAN, F. M. 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS microbiology reviews* **35**:957-976.

WILLEMS, A., DOIGNON-BOURCIER, F., GORIS, J., COOPMAN, R., DE LAJUDIE, P., DE VOS, P., and GILLIS, M. 2001. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**:1315-1322.

WILLIAMS, P. H. 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **26**:925-932.

WILLIAMS, P. H. and WARNER, P. J. 1980. ColV plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **29**:411-416.

WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **51**:221.

WOLF, A. T. and NUGUES, M. M. 2013. Predation on coral settlers by the corallivorous fireworm *Hermodice carunculata*. *Coral Reefs*:1-5.

ZAHA, A. F., H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. 2003. Série Ciência XXI: Biologia molecular básica. Page 424 pg. Mercado Aberto, Porto Alegre.

