

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos

GUSTAVO VASCONCELOS BASTOS PAULINO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS NÃO-CULTIVAVÉIS ASSOCIADAS AO
ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***

**MACEIÓ - AL
2017**

GUSTAVO VASCONCELOS BASTOS PAULINO

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS NÃO-CULTIVAVÉIS ASSOCIADAS AO ZOANTÍDEO
Palythoa caribaeorum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Fontes Landell

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Broetto

MACEIÓ - AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

P328c Paulino, Gustavo Vasconcelos Bastos.
Diversidade de bactérias não-cultiváveis associadas ao zoantídeo
Palythoa caribaeorum / Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino. – 2017.
57 f. : il.

Orientadora: Melissa Fontes Landell.

Coorientador: Leonardo Broetto.

Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografias: f. 44-57.

1. Pirosequenciamento. 2. Cnidários. 3. *Palythoa caribaeorum*.
4. Coral holobionte. 5. Microbiologia. I. Título.

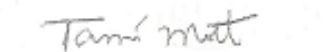
CDU: 579.22

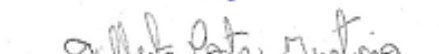
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
PPG-DIBICT

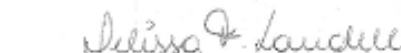
Ata da banca de defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação (PPG-DIBICT), de **Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino** realizada dia 14 de fevereiro de 2017.


Às quatorze horas do décimo quarto dia do mês de fevereiro de 2017, reuniu-se a banca de defesa pública de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, no Instituto de Ciências Biológica e da Saúde da UFAL com os professores doutores avaliadores: Prof. Dr. Alexandre José Macedo (UFRGS), Profa. Dra. Tami Mott (UFAL) e Prof. Dr. Gilberto Justino (UFAL); com a presença da Profa. Dra. Melissa Fontes Landell / UFAL (orientadora) e do Prof. Dr. Leonardo Broetto (co-orientador), para avaliar a dissertação do mestrando Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino. Durante a apresentação foi avaliada a compatibilidade do trabalho de pesquisa com o nível de mestrado e a autoria do discente, sendo arguido o mestrando foi capaz de responder pelas informações e procedimentos apresentados. Também foi avaliado se a dissertação contém produção científica para gerar um artigo para revista científica com QUALIS B1 ou superior, conforme comitê de Biodiversidade da CAPES. Em formulários anexos a esta ata, constam os pareceres finais de cada membro da banca. A defesa pública foi Arrevedada. Sendo o ato de defesa finalizado foi lavrada a presente ata que por todos será assinada.


Prof. Dr. Alexandre José Macedo/UFRGS
(membro titular)


Profa. Dra. Tami Mott /UFAL
(membro titular)


Prof. Dr. Gilberto Costa Justino /UFAL
(membro titular)


Profa. Dra. Melissa Fontes Landell
/UFAL (orientadora)


Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino
(Mestrando)


Leonardo Broetto/UFAL
(co-orientador)

Folha de aprovação

Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS NÃO-CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO ZOANTÍDEO *PALYTHOA CARIBAEORUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Dissertação aprovada em 14 de fevereiro de 2017.

Profa. Dra. Melissa Fontes Landell/UFAL
Orientadora

Prof. Dr. Leonardo Broetto/UFAL
Co-orientador

Prof. Dr. Alexandre José Macedo/UFAL
(membro titular)

Prof. Dr. Gilberto Costa Justino/UFAL
(membro titular)

Profa. Dra. Tamí Mott/UFAL
(membro titular)

MACEIÓ - AL
Fevereiro / 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e me abençoado nessa caminhada.

À meus pais, pelo apoio e amor incondicional e por tudo o que sou hoje.

À minha namorada Kliris Leite, pelo seu carinho e momentos de alegria ao longo desses dois anos.

A toda minha família pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, Melissa Landell, por acreditar em mim e por sua fundamental contribuição para a minha formação.

À meu co-orientador, Leonardo Broetto, por toda paciência e conhecimento transmitido ao longo de todo o trabalho.

À todos os membros da banca, que disponibilizaram um pouco do seu tempo para contribuir com esse trabalho.

A todos os colegas de laboratório, em especial meu amigo Ciro Ramon, por sempre me ajudarem, me ensinarem, pela amizade e momentos de descontração ao longo desses anos.

A todos os meus amigos da Universidade, pela paciência e apoio.

Ao colega Williams Fagner pela ajuda na construção dos mapas presentes no trabalho.

À Capes pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao PPG DIBICT e à UFAL, pelo apoio institucional.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

*Biologia só têm sentido
se nos ajudar a ver o mundo melhor
e se nos mostrar
que o conhecimento sobre tudo que é vivo
não está limitado
no que é passível de fazer sentido*

RESUMO

Grande parte da rica diversidade genética e metabólica marinha ainda não explorada encontra-se nos recifes de coral. Além da macrodiversidade, os recifes de coral suportam diversos micro-organismos que desempenham um importante papel na saúde do hospedeiro, provendo uma fonte de alimento e ocupando nichos específicos, formando uma complexa comunidade hoje denominada coral holobionte. A espécie *Palythoa caribaeorum* é um zoantídeo zooxantelado apontado como espécie-chave nos recifes do nordeste brasileiro, e que até então não possuía sua comunidade bacteriana caracterizada. Nosso trabalho visou a descrição do inventário taxonômico das bactérias associadas ao coral *P. caribaeorum* através do pirosequenciamento parcial do gene rRNA 16S. As coletas foram realizadas em março de 2015, em dois locais: recife de coral da Ponta Verde e recife de arenito da Sereia, ambos em Maceió - AL. Fragmentos de seis colônias saudáveis diferentes de *P. caribaeorum* tiveram seu DNA genômico total extraído e sequenciado através de um pirosequenciador. As sequências obtidas foram analisadas de acordo com o protocolo proposto pelo Projeto Microbioma Brasileiro. Foram obtidas no total 26.166 sequências, reduzidas para 8.988 após o controle de qualidade, gerando um total de 459 OTU's com identidade de 97%. Em todos os níveis taxonômicos a diversidade encontrada foi maior no recife da Sereia, como também a quantidade de sequências classificadas como "não-cultivadas". No total, 21 filos foram encontrados, sendo 10 exclusivos do recife da Sereia e apenas 1 da Ponta Verde. Em geral, Proteobacteria (média de 57,4%) foi o filo mais abundante, enquanto a representatividade de outros grupos predominantes, como Actinobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi, foi bastante variável entre as amostras, corroborando com estudos anteriores com outras espécies de *Palythoa*. Além disso, análises de diversidade demonstraram que no recife da Sereia a microbiota associada ao coral foi mais similar e diversa do que a encontrada na microbiota dos corais da Ponta Verde, que demonstraram estar passando por alterações na composição, apresentando cerca de 25% das sequências classificadas como pertencentes à gêneros potencialmente patogênicos de humanos, como *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Propionibacterium*, provavelmente introduzidos pela descarga de esgoto que ocorre na região. Nossos resultados corroboram trabalhos anteriores que também encontraram variações, principalmente na abundância dos grupos compartilhados entre a microbiota de corais coletados de um ambiente não impactado quando comparado com um ambiente afetado por descarga de esgoto. Nossos resultados estendem para os zoantídeos o que já é dito sobre os corais escleractíneos, que espécies diferentes de corais saudáveis possuem comunidades bacterianas distintas e aparentemente específicas em condições normais. Concluímos que a espécie *P. caribaeorum* possui uma rica e diversa comunidade microbiana associada, havendo variação entre os dois pontos coletados, possivelmente causada por fatores antrópicos.

Palavras-Chave: Pirosequenciamento; cnidários; coral holobionte.

ABSTRACT

Much of the rich genetic and marine metabolic diversity not yet exploited is found in coral reefs, which also support several microorganisms that play an important role in host health, providing a source of food and occupying specific niches, forming a complex community currently called holobiont coral. The species *Palythoa caribaeorum* is a zooxantellated zoanthid identified as a key species in the Brazilian Northeast reefs, and that until then did not have its bacterial community characterized. Our work aimed at describing the taxonomic inventory of bacteria associated with coral *P. caribaeorum* through the partial pyrosequencing of the 16S rDNA gene. The collections were carried out in March of 2015, in two places: coral reef of Ponta Verde and sandstone reef of Sereia, both in Maceió - AL. Fragments from six different healthy colonies of *P. caribaeorum* had their total genomic DNA extracted and sequenced through a pyrosequencer. The sequences obtained were analyzed according to the protocol proposed by the Brazilian Microbiome Project. A total of 26,166 sequences were obtained, reduced to 8,988 after quality control, generating a total of 459 OTU's with 97% identity. At all taxonomic levels the diversity found was greater in the Sereia reef, as well as the number of sequences classified as "uncultured". In total, 21 phyla were found, being 10 exclusive of the reef of the Sereia and only one of Ponta Verde. In general, Proteobacteria (average of 57.4%) was the most abundant phylum, whereas the representativity of other predominant groups, such as Actinobacteria, Acidobacteria and Chloroflexi, was quite variable among the samples, corroborating previous studies with other species of *Palythoa*. In addition, diversity analyzes have shown that in the Sereia reef, the microbiota associated with coral was more similar and diverse than that found in the microbiota of the Ponta Verde corals, which showed to be undergoing changes in composition, presenting about 25% of the sequences classified as belonging to genera potentially pathogenic of humans, such as *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Propionibacterium*, probably introduced by the sewage discharge that occurs in region. Our results corroborate previous work that also found variations, mainly in the abundance of the groups shared between the coral microbiota collected from an unconfined environment when compared to an environment affected by sewage discharge. Our results extend to zoanthids what has already been said about scleractin corals, which different species of healthy corals have distinct and apparently specific bacterial communities under normal conditions. We conclude that the species *P. caribaeorum* has a rich and diverse microbial community associated, having variation between the two points collected, possibly caused by anthropic factors.

Key-word: Pyrosequencing; cnidarians; coral holobiont.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa com os principais pontos costeiros impactados ao redor do mundo afetados por descarga de esgoto..... 8
- Figura 2** - Exemplo de colônia de *Palythoa caribaeorum*..... 11
- Figura 3** - Esquema da estrutura do gene 16S rDNA..... 13
- Figura 4** - Esquema com as reações enzimáticas que ocorrem durante o pirosequenciamento..... 16
- Figura 5** - Estrutura dos corais escleractíneos..... 21
- Figura 6** - Mapa situando os dois pontos de coleta amostrados no trabalho 24

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Média dos parâmetros ambientais aferidos junto com cada amostra de <i>Palythoa caribaeorum</i>	29
Tabela 2 - Potenciais papéis ecológicos de alguns dos grupos bacterianos encontrados em associação a <i>Palythoa caribaeorum</i> , atribuídos com base na literatura.....	38
Gráfico 1 - Número de táxons identificados em cada nível hierárquico dentre as sequências de bactérias obtidas através do pirosequenciamento das amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	30
Gráfico 2 - Abundância dos principais filos de bactérias encontradas em associação com as amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	31
Gráfico 3 - Abundância das principais classes de bactérias encontradas em associação com as amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	32
Gráfico 4 - Abundância das principais ordens de bactérias encontradas em associação com as amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	33
Gráfico 5 - Abundância dos principais gêneros de bactérias encontradas em associação com as amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	35
Gráfico 6 - Número de OTU's classificados como não-cultivados encontrados dentre as sequências de bactérias associadas ao coral <i>Palythoa caribaeorum</i> coletados nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.....	39
Gráfico 7 - Média dos índices de dominância e equitatividade observados nas comunidades bacterianas nos recifes da Ponta verde e Sereia.....	40
Gráfico 8 - Análise de Coordenadas Principais (PcoA) da matriz de distância UniFrac de forma ponderada e não-ponderada das comunidades bacterianas associadas as amostras de <i>Palythoa caribaeorum</i> obtidas nos recifes da Ponta Verde e Sereia.....	42

SUMÁRIO

Parte 1: Texto Principal.....	01
1 Introdução.....	02
2 Objetivos.....	05
3 Revisão de Literatura.....	06
3.1 O ambiente marinho e os recifes de corais.....	06
3.2 O filo Cnidaria e o zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i>	09
3.3 Biologia Molecular e Ecologia Microbiana.....	12
3.4 Metagenômica.....	14
3.5 Sequenciadores de Nova Geração e pirosequenciamento	15
3.6 Bactérias marinhas e suas associações com corais.....	17
4 Metodologia.....	23
4.1 Coleta de amostras.....	23
4.2 Extração de DNA das comunidades microbianas.....	24
4.3 Purificação e quantificação.....	25
4.4 PCR para preparação da biblioteca de amplicons para pirosequenciamento.....	25
4.5 Análise das sequências de amplicons 16S rDNA.....	26
5 Resultados e Discussão.....	28
5.1 Classificação taxonômica das sequências.....	28
5.2 Análises de Diversidade.....	39
6 Considerações Finais.....	44
Referências Bibliográficas.....	46
Parte 2: Artigos Científicos.....	60
1 Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral <i>Palythoa caribaeorum</i> due to anthropogenic effects.....	61
2 Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of <i>Candida haemulonii</i> and <i>Cutaneotrichosporon dermatis</i> isolated from soft corals on the Brazilian reefs.....	68

Parte 1: Diversidade de bactérias não-cultiváveis

1. Introdução

Os recifes de corais formam o mais produtivo e diverso dos ecossistemas marinhos. Estima-se que, apesar de ocuparem apenas 0,2% dos oceanos em todo mundo, os recifes possuam 25% de toda a diversidade marinha (Davidson, 1998). Além disso, fornecem uma fonte fundamental de recursos para muitas nações através da pesca e gerando renda através do turismo (Moberg e Folke, 1999). No Brasil, os recifes de corais são considerados uma área prioritária para a conservação da biodiversidade no Oceano Atlântico, pois embora apresentem um pequeno tamanho (5% dos recifes do Atlântico), possuem uma alta taxa de endemismo de suas espécies de corais (Moura, 2000). Contudo, apesar de sua importância, muitos recifes de corais têm diminuído nas últimas décadas devido a muitos estresses locais, como poluição, superexploração, turismo desgovernado, entre outros fatores.

Em Alagoas, os recifes estão localizados na costa ou perto de áreas urbanas, como é o caso do recife de coral da Ponta Verde e arenito de Sereia, que além de sofrerem com alterações ambientais diárias, características dessas formações, ainda estão sujeitos a influência antrópica. Nestes casos, a descarga direta de esgoto é uma importante fonte de poluição que pode elevar as concentrações de nutrientes do ambiente (Reopanichkul *et al.*, 2009). Dentre as centenas de compostos diferentes que podem ser encontrados nessas águas, os mais comuns são água doce, nutrientes inorgânicos, agentes patogênicos, sólidos em suspensão, sedimentos, metais pesados e outras toxinas (Thurber *et al.*, 2009). Juntos, estressores climáticos e antrópicos levam à mudanças na composição das comunidades bacterianas dos recifes de coral, comprometendo o funcionamento normal das espécies de coral e predispondo-as à infecções oportunistas (Harvell *et al.*, 1999; Lesser *et al.*, 2007).

Dentre os principais corais encontrados nos recifes do Brasil estão o gênero *Palythoa*, que apresenta 92 espécies e *Zoanthus* spp.. Juntos, constituem os gêneros de zoantídeos mais comumente encontrados em águas rasas ao longo da costa brasileira (Boscolo e Silveira, 2005). A espécie *P. caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) é um zoantídeo zooxantelado conhecido por formar extensos "tapetes" localizados nas

áreas submersas (Silva *et al.*, 2015). Geralmente dominante onde ocorre, essa característica é facilitada por diversos fatores, que incluem sua elevada tolerância a estresses ambientais, plasticidade colonial (De Santana *et al.*, 2014), alta taxa de crescimento e reprodução (contínua ao longo do ano, sexuada e assexuadamente) (Gleibs *et al.*, 1995), pela produção, através de seus pólipos, de um muco que protege a colônia contra o acúmulo de sedimento e também dessecação quando há exposição durante a maré baixa (Soares *et al.*, 2006), além de produzirem palitoxina, considerada uma das mais complexas e potentes toxinas marinhas (Habermann e Chhatwal, 1982).

Após vários estudos, os corais passaram a ser reconhecidos como seres holobiontes, por formarem uma complexa associação com diversos micro-organismos que habitam seus tecidos, como bactérias, vírus, arqueias e fungos (Rohwer *et al.*, 2002). Vários estudos mostram que estes micro-organismos podem desempenhar um importante papel sobre a saúde do hospedeiro, provendo uma fonte de alimento, ocupando nichos específicos (Ritchie, 2006) e auxiliando no combate de possíveis patógenos para o hospedeiro, já que os corais carecem de sistema imunológico adaptativo (Rosenberg *et al.*, 2007).

Com o avanço da biologia molecular, a microbiologia ganhou novas ferramentas que vieram a suprir diversas carências metodológicas, ampliando dramaticamente nossa visão sobre o mundo microbiano. Dentre as diferentes novas técnicas, a metagenômica, que consiste no estudo do material genético de populações microbianas recuperado diretamente a partir de amostras ambientais, vem emergindo como um poderoso método para pesquisas de ecologia microbiana (Handelsman, 2004). Aliada ao surgimento de sequenciadores de nova geração capazes de realizar o sequenciamento massivo e em paralelo de milhões de sequências à cada corrida, que passaram a permitir a realização de grandes projetos antes inviáveis, grandes progressos foram obtidos na determinação dos organismos que estão presentes em um determinado local, sua distribuição no espaço e no tempo e também sua função no ambiente (Fuhrman *et al.*, 2015).

Desde então, os pesquisadores identificaram uma ampla gama de grupos microbianos associados à corais (Bourne e Munn, 2005; Sweet *et al.*, 2011), sendo interessante notar que as comunidades bacterianas são distintas entre as diferentes espécies de invertebrados marinhos e consideravelmente diferentes da água e sedimento ao redor, sugerindo que a composição da microbiota dos corais é fruto de uma relação espécie-específica (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Rohwer *et al.*, 2002). As variações ambientais que ocorrem no ambiente recifal influenciam tanto o organismo hospedeiro quanto a microbiota associada (Ulstrup *et al.*, 2006), e baseado nessa e outras observações, Reshef e colaboradores (Rosenberg *et al.*, 2007) propuseram a hipótese probiótica, sugerindo que a comunidade microbiana respondia a essas flutuações ambientais, garantindo assim a adaptação do coral holobionte. Mudanças na microbiota normal, geralmente observadas antes de sinais de estresses visíveis nas colônias, podem ser usadas como bioindicadores de doenças ambientais (Pantos *et al.*, 2003).

No Brasil, a primeira caracterização da microbiota de uma espécie de coral foi realizada utilizando bibliotecas de 16S rDNA de bactérias do muco da espécie endêmica *Mussismilia brazilienses* e da água circundante (Reis, 2009). Em relação a espécie *P. caribaeorum*, apesar de toda importância e abundância desta espécie nos recifes brasileiros, apenas um trabalho explorou a microbiota associada ao seu muco (Carlos *et al.*, 2013), e apesar da diversidade encontrada, acredita-se que esta seja muito maior quando somada aos outros micronichos ainda não explorados do coral.

2. Objetivos

Objetivo geral

- Caracterizar taxonomicamente a microbiota associada ao coral *Palythoa caribaeorum* baseado em sequências do gene 16S rDNA de dois locais do litoral de Maceió, Alagoas.

Objetivos específicos

- Analisar a diversidade de comunidades bacterianas associadas ao coral *Palythoa caribaeorum* presente nos dois locais amostrados.
- Comparar a diversidade da comunidade bacteriana encontrada em cada um dos locais amostrados.

3. Revisão de literatura

3.1 O ambiente marinho e os recifes de corais

Os mares e os oceanos se estendem por cerca de 363 milhões de km², ocupando aproximadamente 70% da superfície terrestre e possuindo profundidade média de 3.800 metros (Costanza, 1999). Estima-se que os oceanos sejam responsáveis por mais de 35% da produção primária do planeta, além de fornecerem cerca de 300 vezes mais espaço para a vida do que os ambientes terrestres e de água doce juntos (Lalli, 2013). De acordo com a Avaliação Global da Biodiversidade, produzida pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, existem 178 mil espécies marinhas, compreendendo 34 filos (Diversity, 2010).

As condições extremas desse ambiente, com suas grandes variações em fatores ambientais como temperatura, salinidade, disponibilidade de matéria orgânica e pH, por exemplo, impulsionaram os micro-organismos marinhos a desenvolverem uma grande diversidade biológica e genética (Sogin *et al.*, 2011). Devido às complexas condições de vida e diversidade de espécies, o metabolismo secundário de micro-organismos marinhos apresenta grandes novidades, constituindo uma potencial fonte para descoberta de novos micro-organismos e também de compostos bioativos de interesse biotecnológico (Baharum *et al.*, 2010).

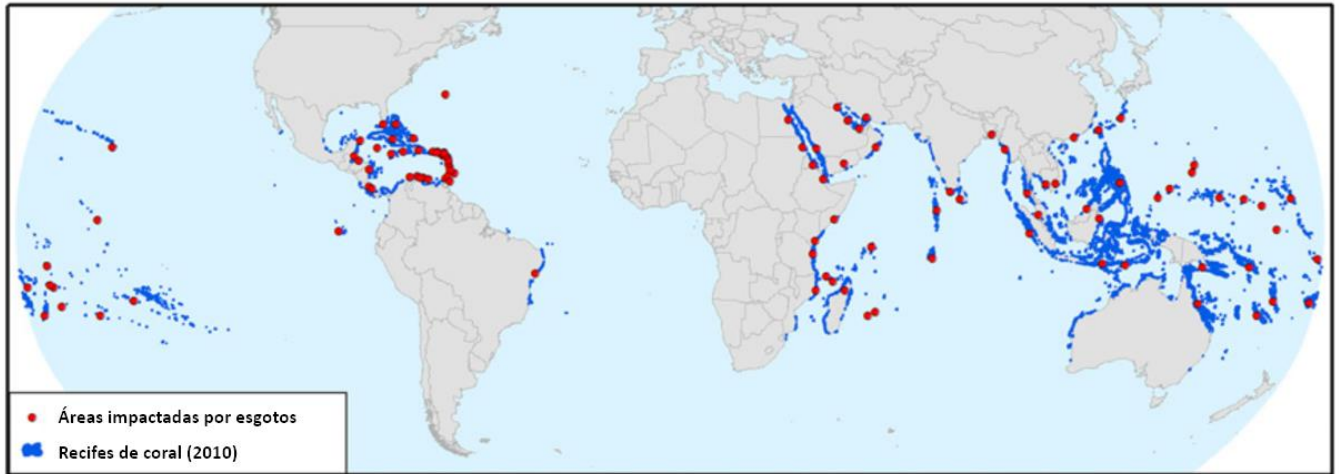
Grande parte dessa diversidade é encontrada nos recifes de coral, que são a base de um ecossistema produtivo e sustentável, fornecendo uma fonte fundamental de recursos para muitas nações através da pesca e gerando renda através do turismo (Moberg e Folke, 1999). Apesar de ocuparem apenas 0,2% dos oceanos em todo mundo, sua complexidade topográfica e produção primária única sustentam aproximadamente 25% de todas as espécies marinhas conhecidas (Knowlton e Jackson, 1999). Além da rica biodiversidade que abrange desde pequenos invertebrados até

grandes mamíferos, os recifes suportam uma grande gama de micronichos onde há dominância de micro-organismos (Bourne e Munn, 2005).

No Brasil, os recifes de corais ocorrem principalmente na costa do Nordeste, sendo Abrolhos, na Bahia, o maior banco de recifes do Brasil (Wilkinson, 2004). Os recifes brasileiros são considerados uma área prioritária para a conservação da biodiversidade no Oceano Atlântico, porque embora possuam um pequeno tamanho (5% dos recifes do Atlântico), possuem uma alta taxa de endemismo de suas espécies de corais (Moura, 2000). A costa do estado de Alagoas possui numerosas formações recifais, representadas por recifes de coral e arenito, que se estendem desde o litoral até alguns metros de profundidade (Cedro *et al.*, 2007). Alguns estão localizados na costa ou perto de áreas urbanas, como é o caso do recife de coral da Ponta Verde e arenito de Sereia, que além de sofrerem com alterações ambientais diárias características dessas formações podem ainda estar sujeitos a influência antrópica (Correia e Sovierzski, 2005).

Apesar dos diversos recursos ecossistêmicos oferecidos servirem como fonte de renda para aproximadamente meio bilhão de pessoas, os recifes de coral sofreram um declínio significativo ao longo das últimas quatro décadas, apresentando perda global de 19% de cobertura total (Wear e Thurber, 2015). No Caribe, por exemplo, estima-se que 80% da cobertura dos recifes tenha sido perdida, grande parte devido à doenças causadas por micro-organismos em resposta à variações climáticas e ambientais (Wilkinson, 2004; Rosenberg *et al.*, 2007; Bourne *et al.*, 2008). Monitoramentos de longo prazo sugerem que o declínio global da cobertura dos corais é causado principalmente pela pesca excessiva, mudanças climáticas e distúrbios devido ao escoamento de rios enriquecidos com nutrientes e sedimentos (Pandolfi *et al.*, 2003). Em águas costeiras (Figura 1), a descarga direta de esgoto é uma importante fonte de poluição que pode elevar as concentrações de nutrientes do ambiente (Reopanichkul *et al.*, 2009). Dentre as centenas de compostos diferentes que podem ser encontrados nessas águas, os mais comuns são água doce, nutrientes inorgânicos, agentes patogênicos, sólidos em suspensão, sedimentos, metais pesados e outras toxinas (Wear e Thurber, 2015).

Figura 1: Mapa com os principais pontos costeiros ao redor do mundo afetados por descarga de esgoto.



Fonte: Adaptado de Reopanichkul *et al.*, 2009.

Como consequência do despejo de esgoto, está o crescimento acelerado de micro-organismos limitados pela disponibilidade de nutrientes, r-estrategistas e potencialmente patogênicos dentro da camada mucosa dos corais, perturbando assim a composição do microbioma e levando à mortalidade dos hospedeiros (David *et al.*, 2006). Indiretamente, um mecanismo de *feedback* de matéria orgânica dissolvida envolvendo o crescimento recíproco de macroalgas e micro-organismos é responsável por desequilibrar a comunidade do coral holobionte, resultando no declínio do *fitness* do hospedeiro. Neste caso, exsudatos ricos em açúcares dissolvidos liberados pelas algas podem estimular o crescimento microbiano, resultando em hipoxia localizada e uma comunidade dominada por micro-organismos oportunistas, incluindo agentes patogênicos facultativos (Barott e Rohwer, 2012; Nelson *et al.*, 2013). Juntos, estressores climáticos e antrópicos levam à mudanças na composição das comunidades bacterianas dos recifes de coral, comprometendo o funcionamento normal das espécies de coral e predispondo-as à infecções oportunistas (Harvell *et al.*, 1999; Lesser *et al.*, 2007).

3.2 O filo Cnidaria e o zoantídeo *Palythoa caribaeorum*

Os cnidários são membros fundamentais de comunidades epibentônicas, especialmente em águas tropicais rasas, onde atuam como principais formadores dos recifes de corais (Insel *et al.*, 1995). O termo Cnidaria tem origem do grego *knidos* (urticante), por todos os integrantes do grupo apresentarem organelas chamadas cnidas, dispostas de um longo filamento com espinhos retráteis e substâncias tóxicas, utilizadas para sua defesa e captura de presas (Mcfadden e Collins, 2007). O filo Cnidaria apresenta aproximadamente 13000 espécies, quase todas consideradas tóxicas de alguma maneira (Lazcano-Pérez *et al.*, 2014), e compreende dois clados bem definidos por aspectos morfológicos e características relacionadas ao ciclo de vida: Anthozoa e Medusozoa. O clado Anthozoa é representado por duas subclasses: Octocorallia e Hexacorallia. Esta última compreende os corais escleractínios (principais formadores de recifes), os corais negros, as anêmonas-do-mar e os zoantídeos (Mcfadden e Collins, 2007).

A ordem Zoantharia é cosmopolita e seus representantes são exclusivamente marinhos, muito semelhantes aos corais escleractíneos por serem coloniais, sésseis e bentônicos. O grupo compreende espécies que se desenvolvem em colônias de pólipos clonais desprovidos de esqueleto de carbonato de cálcio (Sinniger *et al.*, 2005) capazes de cobrirem acima de 50% do substrato em determinadas localidades, sendo comumente usadas por vários vertebrados e invertebrados como proteção, abrigo ou fonte de alimento (Pérez *et al.*, 2005). Como a maioria das espécies são coloniais e carecem de esqueleto, o táxon é muitas vezes considerado como intermediário entre corais duros (Scleractinia) e anêmonas do mar (Actiniaria) (Reimer *et al.*, 2008). Como muitos corais escleractíneos construtores de recifes, os zoantídeos estão em simbiose com espécies de dinoflagelados fotossintetizantes pertencentes ao gênero *Symbiodinium* (conhecidos como zooxantelas), encontrados geralmente no tecido gastrodérmico do hospedeiro (Reimer *et al.*, 2012), são responsáveis por conferir cor ao coral, realizar fotossíntese e disponibilizar aos corais fontes de carbono. Produzem ainda

grande parte do oxigênio utilizado na respiração do coral e dos micro-organismos associados (De Santana *et al.*, 2014; Rådecker *et al.*, 2015). Os zoantídeos são conhecidos por dominarem regiões que apresentam condições estressantes para corais escleractíneos, como observado em algumas águas da Jamaica e do Brasil (Silva *et al.*, 2015). O último levantamento realizado sobre o grupo em águas brasileiras registrou a ocorrência de 13 diferentes espécies, incluindo dois novos registros (Santos *et al.*, 2015). A última reclassificação da ordem Zoantharia, feita com base em sequências dos genes mitocondriais 12S e 16S rDNA, apresenta 4 famílias: Epizoantidae, Parazoanthidae, Zoanthidae e Sphenopidae (Sinniger *et al.*, 2005).

O gênero *Palythoa* (Lamouroux, 1816) é um dos dois gêneros pertencentes à ordem Sphenopidae. O grupo abriga 92 espécies, e junto com *Zoanthus* spp., constituem os gêneros de zoantídeos mais comumente encontrados em águas rasas ao longo da costa brasileira (Boscolo e Silveira, 2005). A espécie *P. caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) é um zoantídeo zooxantelado comum nos recifes do Caribe e do Brasil, e provavelmente em grande parte da costa oeste africana. Colonial, *P. caribaeorum* forma extensos "tapetes" localizados nas áreas submersas (Silva *et al.*, 2015). A presença das zooxantelas em seus tecidos e sua dependência por luz limita a profundidade onde a espécie pode ser encontrada em até no máximo 15 metros (Sebens, 1982). Geralmente dominante onde ocorre, essa característica é facilitada por diversos fatores, que incluem sua elevada tolerância a estresses ambientais, plasticidade colonial (De Santana *et al.*, 2014), alta taxa de crescimento e reprodução (contínua ao longo do ano, sexuada e assexuadamente) (Gleibs *et al.*, 1995) e pela produção, através de seus pólipos, de um muco que protege a colônia contra o acúmulo de sedimento e também dessecação quando há exposição durante a maré baixa, uma característica que dá à espécie o nome popular de "baba-de-boi" (Soares *et al.*, 2006). Além disso, produzem palitoxina, considerada uma das mais complexas e potentes toxinas marinhas, atuando através da Na⁺/K⁻ ATPase (Habermann e Chhatwal, 1982), componente crucial das membranas celulares, induzindo a formação de poros e resultando na degradação do potencial transmembranar (Seemann *et al.*, 2009).

Figura 2: Exemplo de colônia de *Palythoa caribaeorum*.



Fonte: <http://www.medemaatjes.nl/>

A espécie *P. caribaeorum* é apontado como um organismo chave no funcionamento dos recifes de coral do nordeste brasileiro, atuando como um *link* de transferência de energia e apresentando papel similar aos corais escleractíneos ao redor do mundo (De Santana *et al.*, 2014). A espécie ocorre por quase toda a costa ocidental atlântica, tendo Bermuda como limite de distribuição ao norte do Oceano Atlântico (Kemp *et al.*, 2006). Outros registros são reportados para o Sul da Flórida, passando pelo Caribe (Reimer *et al.*, 2008). Este zoantídeo acompanha praticamente toda a distribuição dos ambientes recifais ao longo da costa brasileira, podendo ser encontrado desde a costa do Ceará até Santa Catarina (Bouzon, 2012). A espécie também ocorre em Ilhas Oceânicas, como no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (Amaral, 2000), Fernando de Noronha e na Ilha Trindade (Amaral, 2009). Na Costa Atlântica Oriental, *P. caribaeorum* foi registrado em Cabo Verde (Reimer, 2010) e na República Democrática de São Tomé e Príncipe (Wirtz, 2008), entretanto, existem indícios de que sua distribuição seja mais ampla na costa oeste africana, baseando-se na distribuição de organismos provavelmente sinonimizados (Reimer *et al.* 2010).

3.3 Biologia Molecular e Ecologia Microbiana

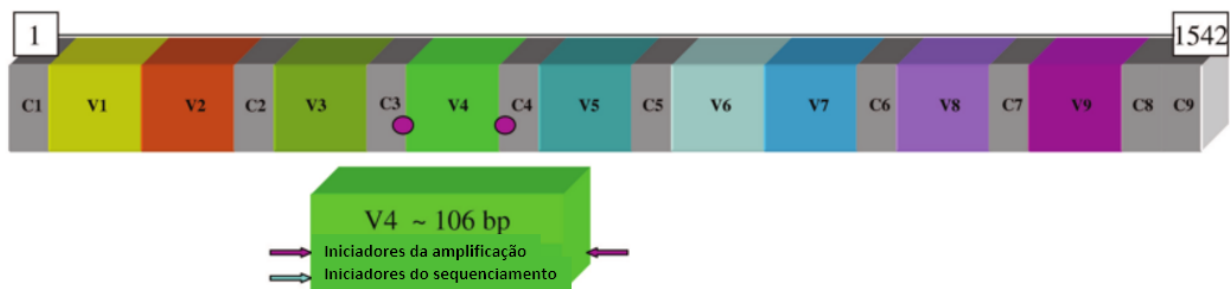
A microbiologia tem passado por uma grande evolução ao longo dos últimos 30 anos, e isso tem alterado como os micro-organismos são vistos e como podem ser estudados (Handelsman, 2004). Um importante passo nesse sentido foi o reconhecimento de que a grande maioria dos micro-organismos ainda não são capazes de serem cultivados em meios de cultura. No estudo dos solos, por exemplo, estima-se que apenas 0,1% da diversidade microbiana possa até então ser inventariada através dos métodos que envolvem o cultivo destes micro-organismos (Handelsman *et al.*, 1998). Diversos fatores estão envolvidos no cultivo de micro-organismos, muitos dos quais difíceis de serem recriados em laboratório, como combinações ideais de temperatura, pressão e gases atmosféricos, ausência de simbioses ou nutrientes, entre muitos outros (Simu e Hagström, 2004). Percebeu-se que apesar de permitir um estudo mais completo, que incluía os aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, os métodos dependentes de cultivo não eram suficientes para explorar a enorme diversidade que permanecia desconhecida.

No passado, os avanços na área de diversidade microbiana eram limitados pela carência de técnicas apropriadas. Uma nova era para a ecologia e taxonomia microbiana foi iniciada quando Woese (Woese, 1987) demonstrou que a análise da subunidade ribossomal DNA (16S rDNA) fornecia informações valiosas para a classificação e o estudo das relações filogenéticas de bactérias, e com Lane e colaboradores (Lane *et al.*, 1986) demonstrando ser possível gerar essa informação rápida e diretamente à partir de amostras ambientais, ignorando os passos de cultivo ou clonagem dos micro-organismos associados e permitindo o acesso à diversidade microbiana até então inexplorada.

O gene 16S rDNA em bactérias possui aproximadamente 1,5 kb e sua estrutura consiste de regiões de sequências conservadas intercaladas com 9 regiões hipervariáveis (V1-V9) (Figura 3). Os comprimentos destas regiões hipervariáveis variam

entre cerca de 50 à 100 bases, e as sequências diferem em relação à variação e na sua utilidade correspondente para a identificação microbiana universal (Petrosino *et al.*, 2009), já estando demonstrado diferentes eficácias em relação à identificação de espécies em gêneros diferentes, entretanto, as regiões V2 e V3 são mais eficazes para a identificação universal de gêneros (Chakravorty *et al.*, 2007). O gene 16S rDNA logo foi aceito como um ótimo marcador molecular para procariontes, já que além de apresentar alto conteúdo informativo, possui uma natureza conservativa e distribuição universal, sendo também abundante no interior das células de procariontes (Delong, 1997). A noção de que genes rDNA poderiam identificar um organismo reconstruindo sua filogenia, juntamente com a possibilidade de armazenar essas sequências em bancos de dados, resultou na rápida adoção do gene 16S rDNA como o "padrão ouro" não só para filogenia bacteriana, mas também em estudos de ecologia microbiana (Case *et al.*, 2007).

Figura 3: Esquema da estrutura do gene 16S rDNA em procariontos.



Fonte: Adaptado de Petrosino *et al.*, 2009

A adoção de métodos moleculares se tornou cada vez mais comum, e técnicas como a amplificação direta do gene 16S rDNA a partir de amostras ambientais, hibridização de fluorescência *in situ* (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH), e

métodos de *fingerprinting* passam a fazer parte de grande parte dos trabalhos em ecologia microbiana (Case *et al.*, 2007). Cada metodologia consegue atingir diferentes aspectos das comunidades, mas todas utilizam principalmente o gene 16S rDNA para diferenciar Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) entre procariotos. Diversos trabalhos demonstram que diferentes fatores inerentes aos próprios micro-organismos e aos processos de manipulação das amostras podem alterar o resultado dos sequenciamentos (Pylro *et al.*, 2014), e para corrigir possíveis viéses, a comunidade passou a adotar o índice de 97% de identidade para classificar as sequências obtidas como pertencentes ao mesmo OTU (Gevers *et al.*, 2005). Estas novas abordagens permitem estabelecer relações entre os processos ecológicos no ambiente com populações microbianas específicas e responder a questões importantes para a ecologia microbiana, tais como quais fatores e recursos governam a enorme diversidade genética e metabólica em um ambiente. Geralmente estes métodos apresentam limitações, como o alto-custo, taxa de cobertura, tamanho dos fragmentos de DNA utilizados e complexidade metodológica, por exemplo (Ahmad, 2011; Rincon-Florez *et al.*, 2013).

3.4 Metagenômica

Dentre as novidades tecnológicas, a metagenômica, que consiste no estudo do material genético de populações microbianas recuperado diretamente a partir de amostras ambientais ou complexas, vem emergindo como um poderoso método para pesquisas de ecologia microbiana (Handelsman, 2004). A técnica possui duas abordagens principais, que apresentam diferentes vantagens e limitações, mas que juntas fornecem informações complementares igualmente valiosas. Uma possui como alvo a composição ou dinâmica das comunidades microbianas através de marcadores filogenéticos, como as sequências do gene 16S rDNA (Ainsworth *et al.*, 2007), enquanto a outra foca no potencial metabólico dos grupos presentes, baseando-se na identificação de sequências de genes codificadores de proteínas para verificar as potenciais vias metabólicas disponíveis na comunidade (Tseng e Tang, 2014). Desde então, grandes progressos foram obtidos na determinação dos organismos que estão presentes em um

determinado local, sua distribuição no espaço e no tempo e também sua função no ambiente (Rosenberg *et al.*, 2007; Ainsworth, T. *et al.*, 2010; Bourne *et al.*, 2016).

Dois fatores foram chave no aprimoramento da metagenômica. O primeiro é um maior reconhecimento da importância da associação das comunidades microbianas com os mais diversos substratos e hospedeiros (Petrosino *et al.*, 2009), e da importância ecológica dos micro-organismos. O segundo é o emprego de sequenciadores de nova geração capazes de realizar o sequenciamento massivo e em paralelo de milhões de sequências à cada corrida, que garantiram a automação desses processos e permitiram a realização de grandes projetos antes inviáveis usando o método de sequenciamento de Sanger.

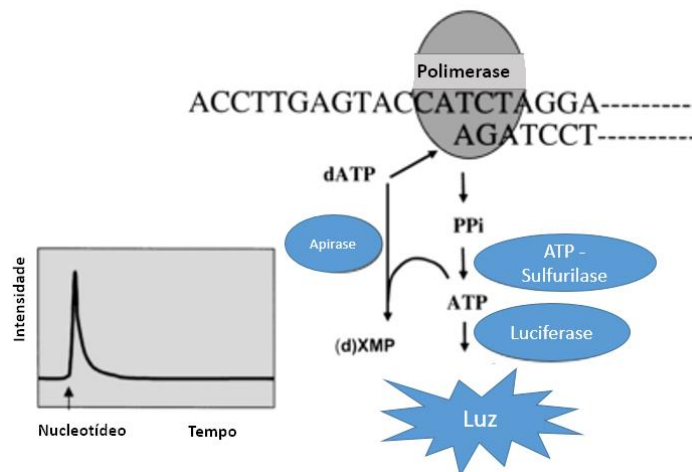
3.5 Sequenciadores de Nova Geração e Pirosequenciamento

Após os princípios básicos do sequenciamento de DNA por terminação de cadeia terem sido estabelecidos por Sanger nos anos 70, a técnica vem sofrendo diversos avanços (Sanger *et al.*, 1977). Nos anos 1990, por exemplo, surgiram os sequenciadores automáticos de DNA, que passaram a usar também dideoxirribonucleotídeos marcados com fluorescência para otimizar o processo (Xu, 2006). Desde então, novos métodos foram propostos e novos aparelhos surgiram. As chamadas tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next-generation sequencing* - NGS) têm revolucionado as pesquisas em genômica e genética por estenderem o processo de eletroforese capilar através de milhões de reações de um modo paralelo e em grande escala, em vez de ser limitado a um único ou alguns fragmentos de DNA (Gilles *et al.*, 2011). Este avanço permite o sequenciamento rápido de grandes extensões de pares de bases de DNA, abrangendo genomas inteiros, com os mais recentes instrumentos capazes de produzir centenas de gigabytes de dados em uma única corrida de sequenciamento (Bomar *et al.*, 2011).

Em 2005, o lançamento pela empresa Roche da plataforma 454, baseada em pirosequenciamento, foi um marco para o sequenciamento de genomas em termos de

custo e performance (Balzer *et al.*, 2011). O pirosequenciamento é um método de sequenciamento de DNA, baseado no princípio do sequenciamento por síntese (Figura 4). A detecção da incorporação das bases difere do sequenciamento de Sanger, pois é baseada na detecção da liberação do pirofosfato, em vez de terminação da cadeia com dideoxynucleotídeos (Nyrén, 1987). A técnica utiliza placas contendo milhares de poços (PicoTiterPlate™), onde cada poço contém, no máximo, uma esfera carregando uma cópia de um único fragmento de DNA fita simples a ser sequenciado (Ronaghi, 2001). O método é baseado na detecção do pirofosfato (PPi) liberado durante a síntese do DNA quando cada nucleotídeo é naturalmente incorporado à sequência. O pirofosfato lançado é usado em uma reação com a enzima sulfúrilase, o que acarreta na liberação de ATP, que reage com outra enzima, a luciferase, convertendo luciferina em oxiluciferina e liberando luz. Em uma cascata de reações enzimáticas, a luz visível gerada é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados e detectada por uma câmera de CCD acoplada ao sequenciador e convertida em picos (Marsh, 2007). Posteriormente, a incorporação da enzima catalítica apirase ao processo eliminou os passos de lavagem, permitindo que os nucleotídeos fossem incorporados sequencialmente (Ronaghi, 2001).

Figura 4: Esquema com as reações enzimáticas que ocorrem durante o processo de pirosequenciamento.



Fonte: Adaptado de Ronaghi, 2011.

Anos depois, a Roche lançou a tecnologia 454 GS-FLX Titanium, capaz de gerar 1.000.000 de sequências em uma única corrida de 10 horas, formando sequências maiores que 500 pb (Gilles, 2011). A qualidade e precisão da informação gerada pela plataforma já foi alvo de discussão entre os pesquisadores, e estudos realizados utilizando a região V6 do gene 16S rDNA demonstraram que a taxa de precisão da plataforma é de em média 99,54%, e que 82% das sequências obtidas não continham erros (Huse e Welch, 2011). Desde então, outras três plataformas de sequenciamento ainda mais poderosas foram lançadas no ano de 2011: Ion Torrent's PGM, Pacific Biosciences' RS e o Illumina MiSeq (Quail *et al.*, 2012).

O pirosequenciamento, aliado ao aumento da capacidade computacional e a bioinformática, permitiu o desenvolvimento substancial das ciências genômicas (Rogers e And Venter, 2005), sendo amplamente aplicado junto com outras técnicas ao estudo da diversidade microbiana (Riesenfeld *et al.*, 2004), incluindo genotipagem, detecção de polimorfismos em apenas um nucleotídeo (SNP's) e identificação de micro-organismos. Hoje, a forma mais comum de se acessar a diversidade microbiana de diversos ambientes o mais próximo possível de sua totalidade baseia-se no uso de sequências de marcadores filogenéticos (*amplicons*), como por exemplo, o gene de 16S rDNA, obtidas graças à sequenciadores de alto rendimento (Simon e Daniel, 2011). O emprego dessas ferramentas permitiu um poder exploratório muito maior do que se era possível até então com a aplicação de outros métodos com finalidades semelhantes, como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE*) e polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism - T-RFLP*) (Muyzer *et al.*, 1993). Além disso, a formação de grandes bancos de dados de sequências de referência, tais como Greengenes, SILVA, ou *Ribossomic Database Project II* (RDP II), fornecem um recurso importante para a classificação de micro-organismos baseada no gene 16S rDNA.

3.6 Bactérias marinhas e suas associações com corais

As bactérias representam um grupo taxonomicamente diverso, biologicamente ativo e que coloniza todos os habitats marinhos, das profundezas dos oceanos aos estuários de águas rasas (Sogin *et al.*, 2011). Os aproximadamente 3,5 bilhões de anos de evolução fizeram com que uma notável diversidade fisiológica e funcional fosse acumulada dentre esses micro-organismos (DeLong, 1997). Dados compilados da literatura revelam que apenas 4500 espécies de bactérias foram descritas, contrastando com as mais de um milhão de espécies eucarióticas descritas (Konstantinidis *et al.*, 2006).

Em conjunto com outros micro-organismos, como fungos, arqueias, protozoários e vírus, as bactérias formam uma complexa comunidade associada aos corais, com densidades estimadas de 1×10^2 a $>1 \times 10^6$ células por centímetro quadrado de tecido hospedeiro, hoje denominada coral holobionte (Rohwer *et al.*, 2002). Diversos estudos mostram que esses micro-organismos podem desempenhar um importante papel sobre a saúde do hospedeiro, provendo uma fonte de alimento e ocupando nichos específicos (Ritchie, 2006). A competição por espaço e nutrientes entre os micro-organismos é ainda uma força seletora que estimula a produção de metabólitos secundários, consequentemente auxiliando no combate de possíveis patógenos para o hospedeiro e mantendo a comunidade microbiana estável (Rosenberg *et al.*, 2007). Entre estes antagonistas de patógenos de corais, algumas espécies de *Vibrio*, *Photobacterium*, *Bacillus* e *Halomonas* já foram recentemente identificadas (Ritchie, 2006).

Trabalhos recentes demonstram a influência de micro-organismos no desenvolvimento e resiliência de corais hospedeiros, onde, por exemplo, a combinação de biofilmes e compostos produzidos por populações específicas de bactérias funcionariam emitindo múltiplos sinais que coordenam o estabelecimento e metamorfose de estágios larvais (Hadfield, 2011). Em outro caso, o tratamento de culturas de larvas de corais com antibióticos foi suficiente para impedir seu estabelecimento e

metamorfose, sugerindo que a ação das bactérias associadas às larvas é fundamental para que o ciclo de vida desses corais continue (Vermeij *et al.*, 2009).

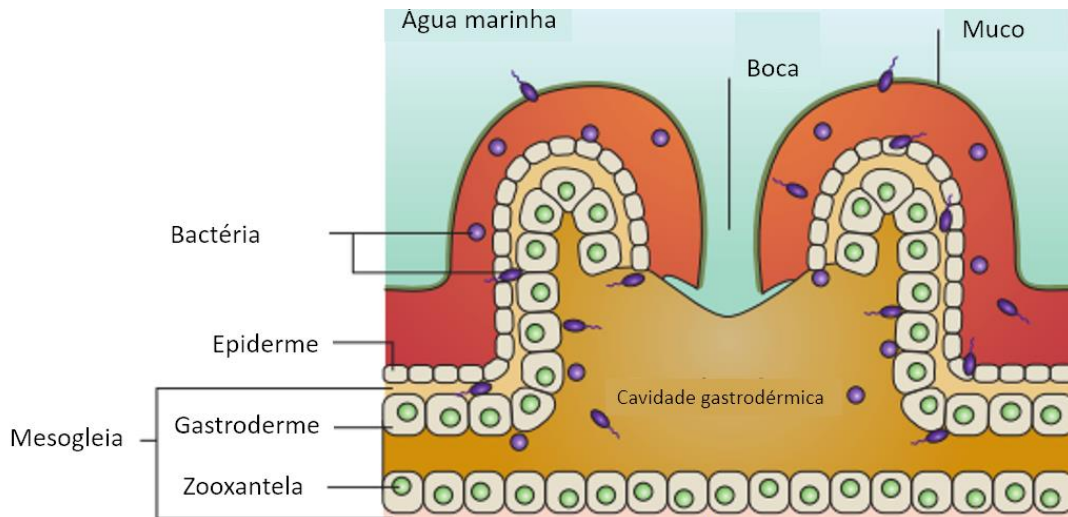
Os primeiros estudos de microbiologia de corais utilizaram métodos dependentes de cultivo e se concentraram na microbiota associada ao muco, encontrando uma grande diversidade bacteriana (Ducklow e Mitchell, 1979). Posteriormente, estudos utilizando técnicas independentes de cultivo revelaram uma diversidade ainda maior, incluindo uma maioria de novas espécies, revelando que a composição das comunidades microbianas associadas à esses organismos era muito mais complexa do que se imaginava (Rohwer *et al.*, 2001; Rohwer *et al.*, 2002). Posteriormente, Bourne e Munn (2005) utilizaram ambas as abordagens, dependentes e independentes de cultivo, para investigar a diversidade de bactérias associadas ao coral *Pocillopora damicornis* e encontraram diferentes grupos dominando os resultados de acordo com a técnica utilizada. Esses estudos serviram para demonstrar que os métodos baseados em cultivo não refletiam de forma precisa a composição e diversidade das comunidades microbianas, já que a grande maioria das bactérias marinhas requerem condições nutricionais e físico-químicas até então não replicáveis em laboratório. Além disso, de acordo com o grau de associação entre micro-organismo e hospedeiro, a ausência de fatores chaves para o crescimento inibe o cultivo microbiano (Ainsworth *et al.*, 2007).

Desde então, técnicas independentes de cultivo com base na análise do gene 16S rDNA permitiram que os pesquisadores identificassem uma ampla gama de grupos microbianos associados à corais (Bourne *et al.*, 2005; Sweet *et al.*, 2011). Os principais grupos de bactérias marinhas associadas ao muco e ao tecido de corais identificados até o momento através dessas técnicas são: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinomycetes e Cyanobacteria (Bourne *et al.*, 2016). É interessante notar que as comunidades bacterianas são distintas entre as diferentes espécies de invertebrados marinhos e consideravelmente diferentes da água e sedimento ao redor, sugerindo que a composição da microbiota dos corais é fruto de uma relação espécie-específica (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Rohwer *et al.*, 2002), além de aparentemente não estarem relacionadas com a variação geográfica, já sendo demonstrado que indivíduos

da mesma espécie cultivam comunidades semelhantes mesmo quando coletados em diferentes áreas (Garren e Azam, 2012).

Um dos pontos determinantes da composição da microbiota é a própria estrutura corporal dos corais, que apresenta três possíveis diferentes habitats para micro-organismos. O primeiro é representado pela camada mucosa superficial, composta principalmente por proteínas, lipídios, polissacarídeos e glicoproteínas, o que difere em composição e abundância de recursos da água do mar ou do sedimento marinho (Tremblay *et al.*, 2011). O muco fornece proteção contra UV, dessecação e aumento da carga de sedimentos, além de aumentar a resistência do organismo através de vários mecanismos: incluindo a formação de uma barreira física entre o coral e o ambiente, o transporte mucociliar de micro-organismos para remoção via ingestão pelo coral hospedeiro, evitando assim a colonização por micro-organismos invasores, e atuando como um meio para difusão de compostos com propriedades antimicrobianas (Brown e Bythell, 2005). Após, temos os tecidos (incluindo a cavidade gastrodérmica e epiderme) e o esqueleto de carbonato de cálcio (Figura 5). Cada um desses compartimentos atua como uma espécie de micronicho, apresentando variações na disponibilidade de nutrientes, oxigênio e na forma como interagem com o meio circundante, por exemplo (Bourne *et al.*, 2016), sendo habitados por diferentes espécies de bactérias (Rosenberg *et al.*, 2007) e afetados de forma diferente por fatores abióticos, como o grau de penetração da luz solar e acidificação dos oceanos, capazes de determinar a presença de distintos tipos de *Symbiodinium* e bactérias endolíticas presentes no esqueleto, por exemplo (Blackall *et al.*, 2015). Além disso, acredita-se que substâncias inibidoras de crescimento e/ou adesão bacteriana produzidas tanto pelo coral quanto pela sua microbiota podem ser responsáveis pela seleção das bactérias marinhas aptas a colonizar os tecidos dos corais (Sweet *et al.*, 2011).

Figura 5: Estrutura dos zoantídeos. O grupo difere dos corais escleractíneos por não apresentarem esqueleto de carbonato de cálcio.



Fonte: Adaptado de Rosenberg *et al.*, 2007

Os micro-organismos associados aos corais não são apenas cruciais para o *fitness*, mas também são sensíveis às perturbações ambientais e ao estado fisiológico do seu hospedeiro. Diversos fatores ambientais, como temperatura, intensidade da luz e fluxo da água, conhecidos por variar diária e sazonalmente, influenciam tanto o organismo hospedeiro quanto a microbiota associada (Ulstrup *et al.*, 2006). Baseado nessas observações, Rosenberg e colaboradores (2007) propuseram a hipótese probiótica, sugerindo que mudanças nas comunidades microbianas sob diferentes condições ambientais permitiam uma rápida e versátil adaptação do coral holobionte. Um dos fatos apresentados para sustentar a hipótese consiste que apesar de não apresentarem um sistema imune adaptativo, os corais podem desenvolver resistência a patógenos. Mudanças na microbiota normal, geralmente observadas antes de sinais de estresses visíveis nas colônias, podem ser usadas como bioindicadores de doenças ambientais (Pantos *et al.*, 2003).

Sharp & Ritchie (2012) descreveram um modelo do efeito das mudanças climáticas sobre o sistema holobionte. Nesse modelo, quando há aumento de temperatura na superfície do mar, os compostos antimicrobianos presentes no muco do coral desaparecem e a microbiota, que é normalmente dominada por micro-organismos benéficos, passa a ser predominantemente patogênica. Além disso, acredita-se que o aquecimento global vai aumentar a dispersão, o crescimento e a persistência de bactérias patogênicas em ambientes aquáticos, como as bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* (Vezzulli *et al.*, 2013).

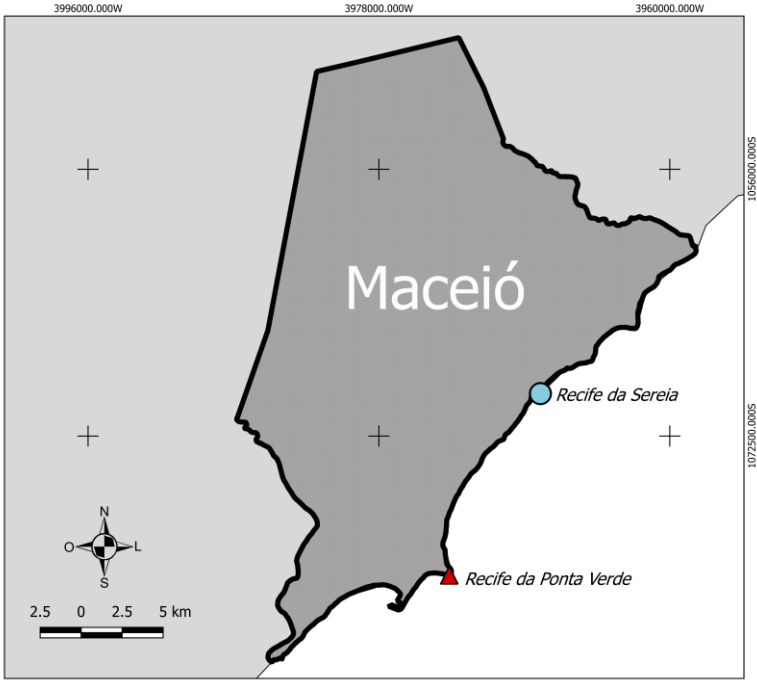
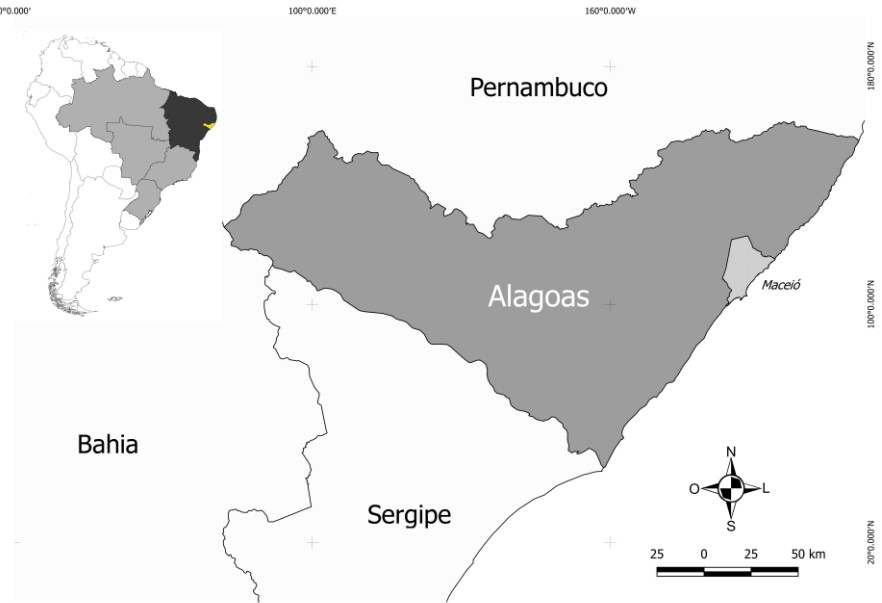
A primeira espécie de coral brasileira a ter sua microbiota caracterizada foi *Mussismilia brazilienses*, endêmica no país, sendo esse trabalho realizado utilizando bibliotecas de 16S rDNA de bactérias do muco de exemplares do coral e da água circundante. Foram identificadas cerca de 170 espécies de bactérias em cada um dos ambientes, mostrando ainda uma certa especificidade da microbiota (Reis, 2009). Desde então, poucos trabalhos foram realizados, e apesar de sua dominância e importância ecológica para os recifes brasileiros, apenas a microbiota associada ao muco da espécie *P. caribaeorum* foi explorada (Carlos *et al.*, 2013), demonstrado que, apesar da diversidade encontrada, ainda há muito a ser analisado quanto ao coral em sua totalidade.

4. Metodologia

4.1 Coleta de amostras

As amostras de *P. caribaeorum* foram coletadas durante o verão (março de 2015) em dois locais em dias consecutivos: recife de coral da Ponta Verde (9 ° 66'32 "S 35 ° 69'82" W), que consiste de uma construção calcária constituída principalmente de esqueletos de corais que podem ser encontrados associados a crostas de algas calcárias e resíduos de carbonato de cálcio de outros invertebrados, localizado em uma área urbana constantemente afetada por esgoto não tratado despejado à partir de conexões ilegais na rede de escoamento de águas pluviais, e o recife de arenito da Sereia (9 ° 56'52 "S 35 ° 64'49" W), uma formação resultante da consolidação de antigas praias, à custa de sedimentação com carbonato de cálcio ou óxido de ferro, posicionado paralelamente à linha de costa e um ponto menos exposto aos efluentes; ambos no Estado de Alagoas, Brasil (Figura 6). Apesar da curta distância entre os dois pontos, o sentido da corrente marítima que percorre a costa da região flui em sentido norte-sul, impedindo que a água contaminada pelo esgoto da Ponta Verde alcance o recife da Sereia (Figura 6) (IBGE, 2011). Em cada local, fragmentos com cerca de 10 cm foram amostrados à partir de três colônias diferentes e aparentemente saudáveis de *P. caribaeorum*, colocados em sacos de plástico estéreis, armazenados em gelo durante o transporte para o Laboratório de Diversidade Molecular - UFAL e congelados a -20°C até a extração de DNA ser realizada. Todas as amostras foram coletadas no período da manhã, durante a maré baixa e estavam localizadas dentro de poças d'água, sem exposição à atmosfera.

Figura 6: Mapa situando no Brasil os dois recifes onde foram coletados os exemplares de *Palythoa caribaeorum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e salinidade) das poças foram medidos com uma sonda multiparâmetros (modelo Hanna HI 9828) e informações sobre condições de banho com base na contagem de coliformes termotolerantes foram obtidas através do IMA (Instituto do Meio Ambiente, Brasil). A permissão foi concedida pelo órgão regulador IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente), através da licença L. 32723-1. 6.

4.2 Extração de DNA das comunidades microbianas

Todas as amostras foram lavadas com água do mar estéril antes da extração de DNA, a fim de remover as bactérias frouxamente ligadas à superfície da amostra. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas utilizando gral e pistilo. Em seguida, 600 uL de tampão de extração CTAB (4 g de CTAB, 16,4 g de NaCl, 20 mL de 1 M de Tris-HCl, 8 ml de 0,5 M de EDTA, 200 ml de água destilada) foi adicionado ao material macerado, seguido por agitação em vórtex. Após incubação à 65 °C durante uma hora, os tubos foram centrifugados à 14.000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram então transferidos para tubos em gelo e extraídos com um volume igual de fenol/clorofórmio. O DNA genômico foi precipitado com acetato de sódio (0,3 M; pH 5,2) e isopropanol e recolhidos por centrifugação à 14.000 rpm durante 15 min. O DNA foi re-suspenso em água Milli-Q ultrapura e armazenado à -20 °C.

4.3 Purificação e quantificação do DNA extraído

Após a extração, o DNA genômico foi purificado utilizando o Kit DNA PowerClean® (Mobio Laboratories, Inc., C), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e a concentração da preparação de DNA foi verificada com o Espectrofotômetro L-2 Quant (Loccus do Brasil Ltda.; comprimento de ondas OD260nm). O DNA genômico extraído foi enviado para o laboratório Molecular Research (Shallowater, TX), responsável por executar o pirosequenciamento.

4.4 PCR para preparação da biblioteca de amplicons para pirosequenciamento

O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 27F (3'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (5' - TACCTTGTTACGACTT). Depois dos 25 ciclos iniciais, mais 5 ciclos foram realizados de modo que cada sequência *barcode* das amostras e os adaptadores A e B foram adicionados. Após o PCR, os produtos de amplificação produzidos a partir de diferentes amostras foram misturados em concentrações iguais e purificados utilizando esferas Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, EUA). As bibliotecas de *amplicons* foram ligadas às esferas sob condições favoráveis para apenas um fragmento por esfera, que foram então emulsionadas numa mistura de PCR em óleo. Os produtos da amplificação foram sequenciados utilizando a tecnologia e reagentes 454 GS FLX, da empresa Roche, de acordo com as orientações do fabricante.

4.5 Análise das sequências de amplicons 16S rDNA

As sequências obtidas foram analisadas de acordo com o protocolo UPARSE + Qiime (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) proposto pelo Projeto Microbioma Brasileiro (BMP), com algumas alterações (Pylro *et al.*, 2014). Brevemente, as sequências foram atribuídas às respectivas amostras de acordo com os seus *barcodes*, que foram então removidos junto com as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores na etapa de *demultiplex*. As sequências foram filtradas de acordo com a qualidade (erro máximo esperado = 1,0) e ajustadas para 250 pb. Nenhuma base ambígua foi admitida. As sequências foram de-replicadas e, simultaneamente, verificadas quanto à presença de quimeras utilizando uma abordagem *de novo* e, mais tarde verificadas novamente usando o UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) contra o banco de dados "Gold" de sequências de 16S (banco de dados de referência do Broad Microbiome Utilities). Sequências com semelhança maior ou igual a 97% foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUS) com o algoritmo USEARCH. A classificação taxonômica foi implementada com o BLAST (e-value = 10⁻⁵) contra 16S rDNA de banco de dados

SILVA (SILVA versão 119, disponível em <http://www.arb-silva.de/>) (Pruesse *et al.*, 2007). Todos os *singletons* foram removidos de análises posteriores.

As sequências mais abundantes para cada OTU foram escolhidas como representantes e depois alinhadas usando o método PyNast, tendo sequências do banco de dados SILVA como referência, e rastreados com máscara Lane para construir uma árvore filogenética usando FastTree (Price *et al.*, 2009). Para avaliar a estrutura da comunidade, a média da quantidade de sequências por amostra foi estabelecida por várias rarefações à menor profundidade do sequenciamento. A diversidade de OTU's foi examinada usando os índices de biodiversidade realizadas pelo pacote *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME v.1.9) (Caporaso *et al.*, 2011). Para comparar a composição da comunidade através das amostras, avaliou-se a beta-diversidade usando o método Unifrac de forma ponderada e não-ponderada (Lozupone e Knight, 2005), que consiste de uma métrica filogeneticamente informativa. Análises de coordenadas principais (PCoA) foram usadas para visualizar as diferenças entre amostras.

5. Resultados e Discussão

5.1 Classificação taxonômica das sequências

Três amostras do zoantídeo *P. caribaeorum* foram obtidas em março de 2015 em cada um dos pontos do litoral de Maceió-AL estudados. O pirosequenciamento das amostras resultou num total de 26.166 sequências do gene 16S rDNA, reduzidas após o controle de qualidade para 8.988 sequências de alta qualidade. No total, 459 OTU's foram gerados à identidade de 97%. Todos os dados de sequências brutas encontram-se depositados no NCBI Sequence Read Archive e podem ser acessados sob Bioproject com número de acesso PRJNA327692.

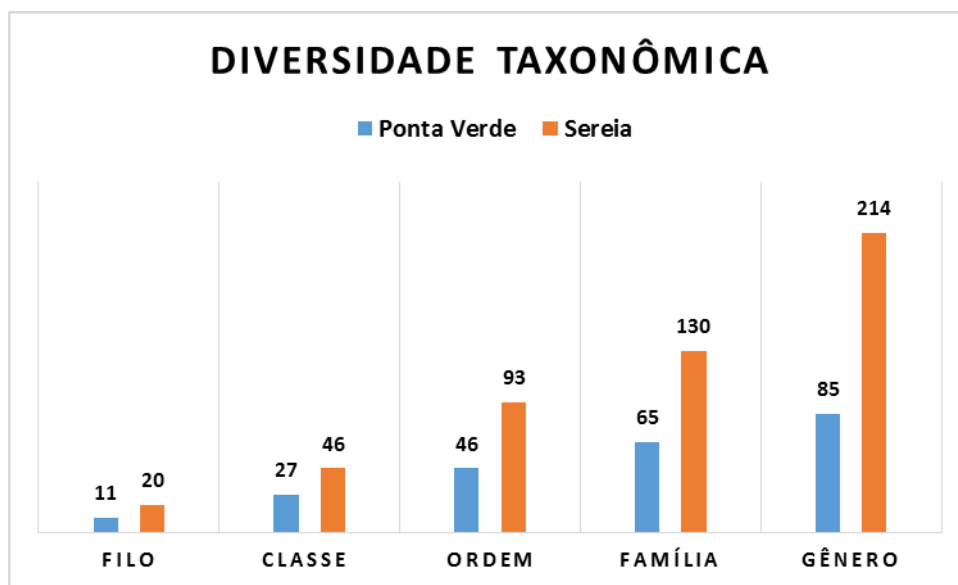
Entre os parâmetros ambientais analisados, as medidas de coliformes termotolerantes a água apresentaram médias significativamente diferentes entre os recifes (Tabela 1). As demais variáveis ambientais, temperatura e salinidade, não mostraram diferença significativa na média entre os dois pontos estudados. Juntamente com espécies do gênero *Streptococcus*, os coliformes termotolerantes são tradicionalmente utilizados como indicadores microbiológicos de qualidade da água (Stabili *et al.*, 2013), apesar de possuírem limitações. Especificamente, as flutuações temporais nas condições ambientais, combinadas com a rápida biodegradação em ambientes marinhos tropicais, tornam difícil avaliar com precisão e quantificar o impacto das alterações da qualidade da água na saúde do ecossistema marinho (Kriwy e Uthicke, 2011) e, por extensão, como esses influenciam na composição da microbiota dos invertebrados marinhos. No entanto, coliformes termotolerantes são um forte indicador da presença de esgoto doméstico e um indício da presença de outros grupos microbianos não reconhecidos, alguns dos quais podendo ser patogênicos (Neill, 2004), já sendo relacionada a proximidade de esgotos e a prevalência de doenças de coral, como *Black Band Disease* e *White-Plague* Tipo II (Post, 2005).

Tabela 1: Média dos parâmetros ambientais aferidos junto com cada amostra de *Palythoa caribaeorum*.

RECIFE	PH	SALINIDADE (%)	TEMPERATURA (°C)	COLIFORMES TERMOTOLERANTES (MPN)
PONTA VERDE	8.04	37.22	29.54	2.400
SEREIA	8.71	37.07	30.75	<18

A classificação taxonômica das sequências retidas no controle de qualidade mostraram um alto nível de diversidade bacteriana associada com o zoantídeo *P. caribaeorum* (Gráfico 1). Entretanto, essa diversidade não foi igualmente distribuída entre os dois pontos estudados, sendo possível observar em todos os níveis taxonômicos uma diversidade superior no recife da Sereia em relação ao recife da Ponta Verde.

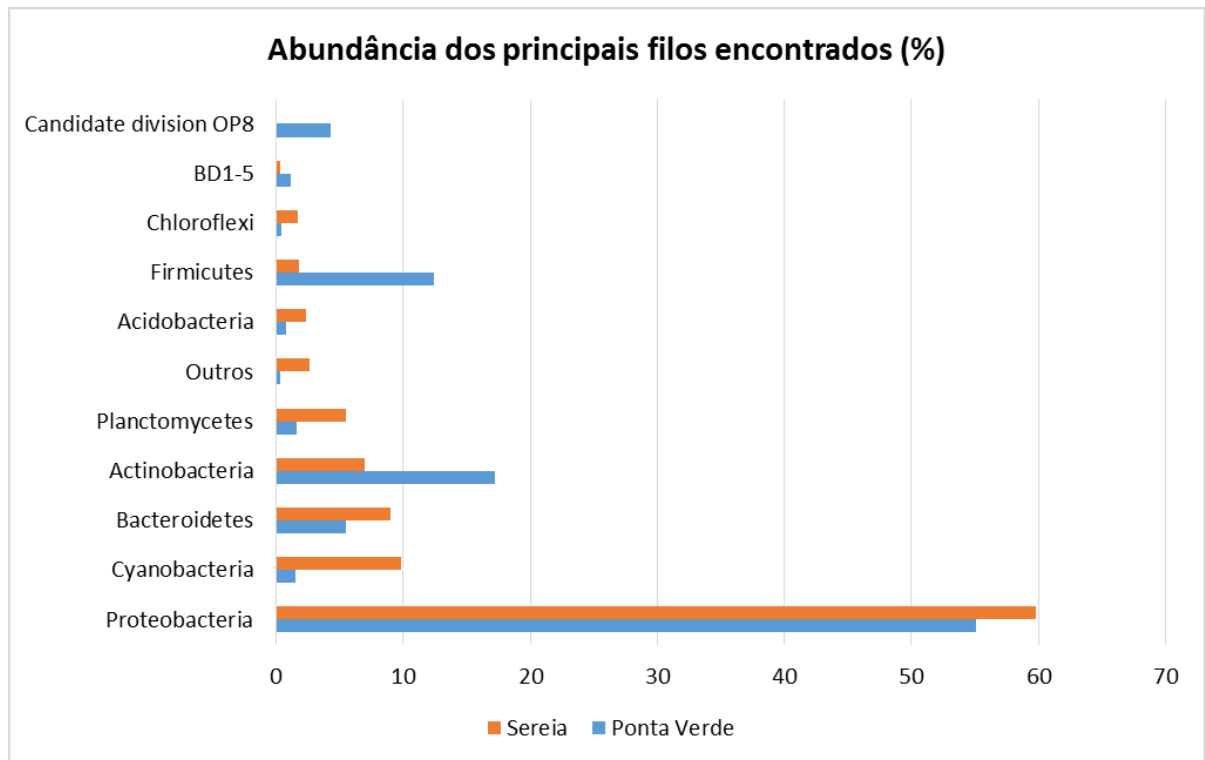
Gráfico 1: Número de táxons identificados em cada nível hierárquico dentre as sequências de bactérias obtidas através do pirosequenciamento das amostras de *Palythoa caribaeorum* coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No total, quinze filos formalmente descritos (Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes e Verrucomicrobia) previamente relatados em associação à corais, e mais seis grupos candidatos à filo (BD1-5, NPL-UPA2, OP8, OP11, TM6 e TM7) foram encontrados (Gráfico 2). Vinte filos foram encontrados no recife da Sereia, enquanto apenas onze foram observados no recife da Ponta Verde. No geral, a este nível taxonômico, a composição das comunidades bacterianas encontradas foi diferente, principalmente no que diz respeito à abundância e número de grupos compartilhados entre os dois recifes. Apenas um filo foi exclusivo do recife da Ponta Verde, enquanto dez ocorreram apenas no recife da Sereia e outros dez grupos foram partilhados entre os dois pontos. Proteobacteria foi o filo mais abundante (média de 57% do total de sequências) nos dois pontos amostrados, enquanto a proporção dos demais filos variou entre recifes. Na Ponta Verde, 17% das sequências foram classificadas como Actinobacteria, seguido por Firmicutes (12,4%) e Bacteroidetes (5,5%), enquanto que na Sereia o principal grupo presente foi Cyanobacteria (9,7%), seguido de Bacteroidetes (9%) e Actinobacteria (7%).

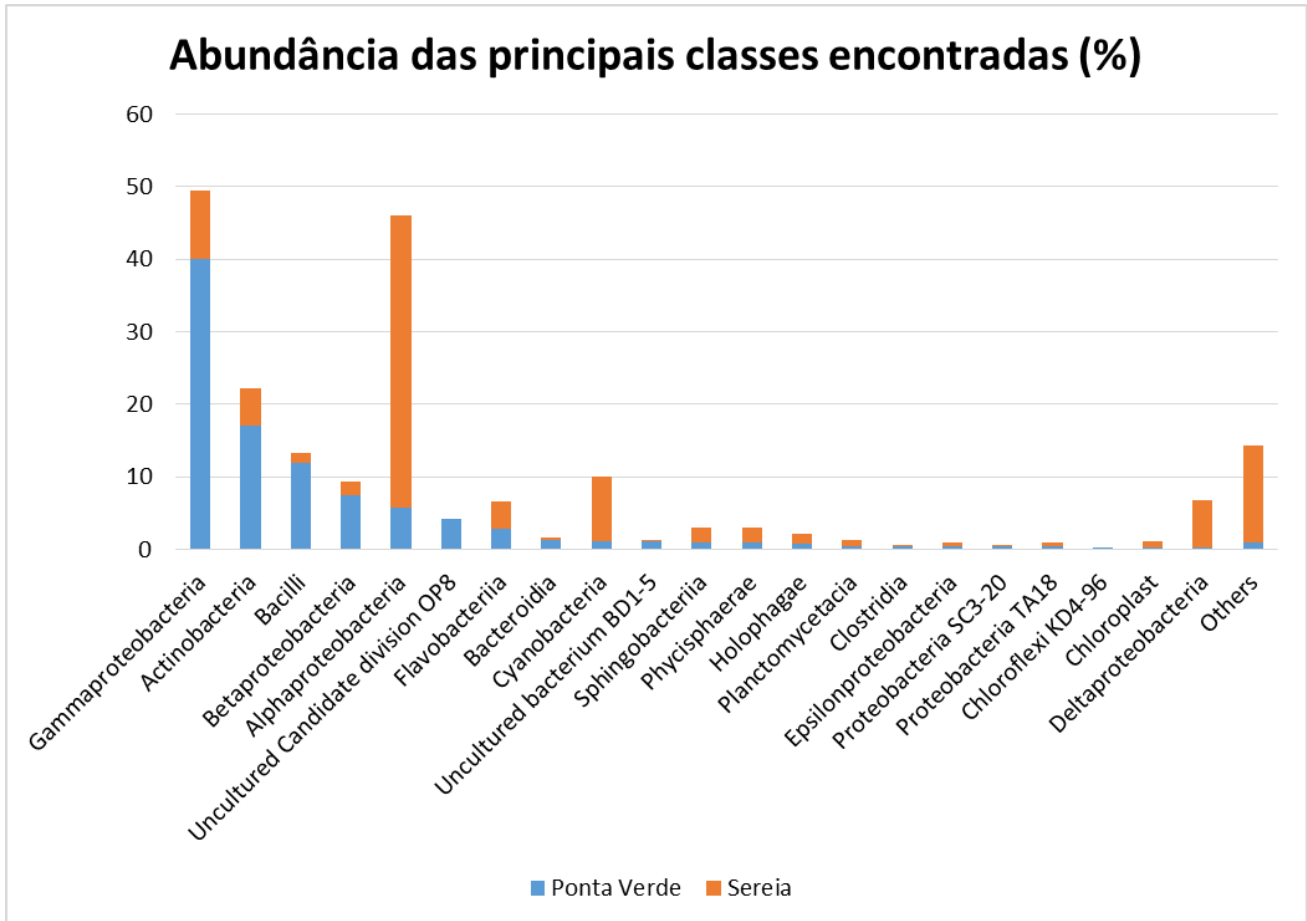
Gráfico 2: Abundância dos principais filos de bactérias encontradas em associação com as amostras de *Palythoa caribaeorum* coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A classificação taxonômica à nível de classe das OTU's formadas revelou um total de 48 grupos, sendo observadas grandes variações entre os dois pontos (Gráfico 3). O recife da Ponta Verde apresentou duas classes como exclusivas do local, enquanto 25 foram presentes nos dois locais amostrados e vinte e uma classes ocorreram apenas no recife da Sereia (Fig. 5). As amostras coletadas na Sereia exibiram uma alta abundância de Alphaproteobacteria (40,2%), seguido por Gammaproteobacteria (9,4%) e Cyanobacteria (8,9%). Em contraste, o recife da Ponta Verde apresentou a classe Gammaproteobacteria (40,1%) como grupo mais abundante, seguido por Actinobacteria (17%) e Bacilli (12%).

Gráfico 03: Abundância das principais classes de bactérias associadas com as amostras de *Palythoa caribaeorum* coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.

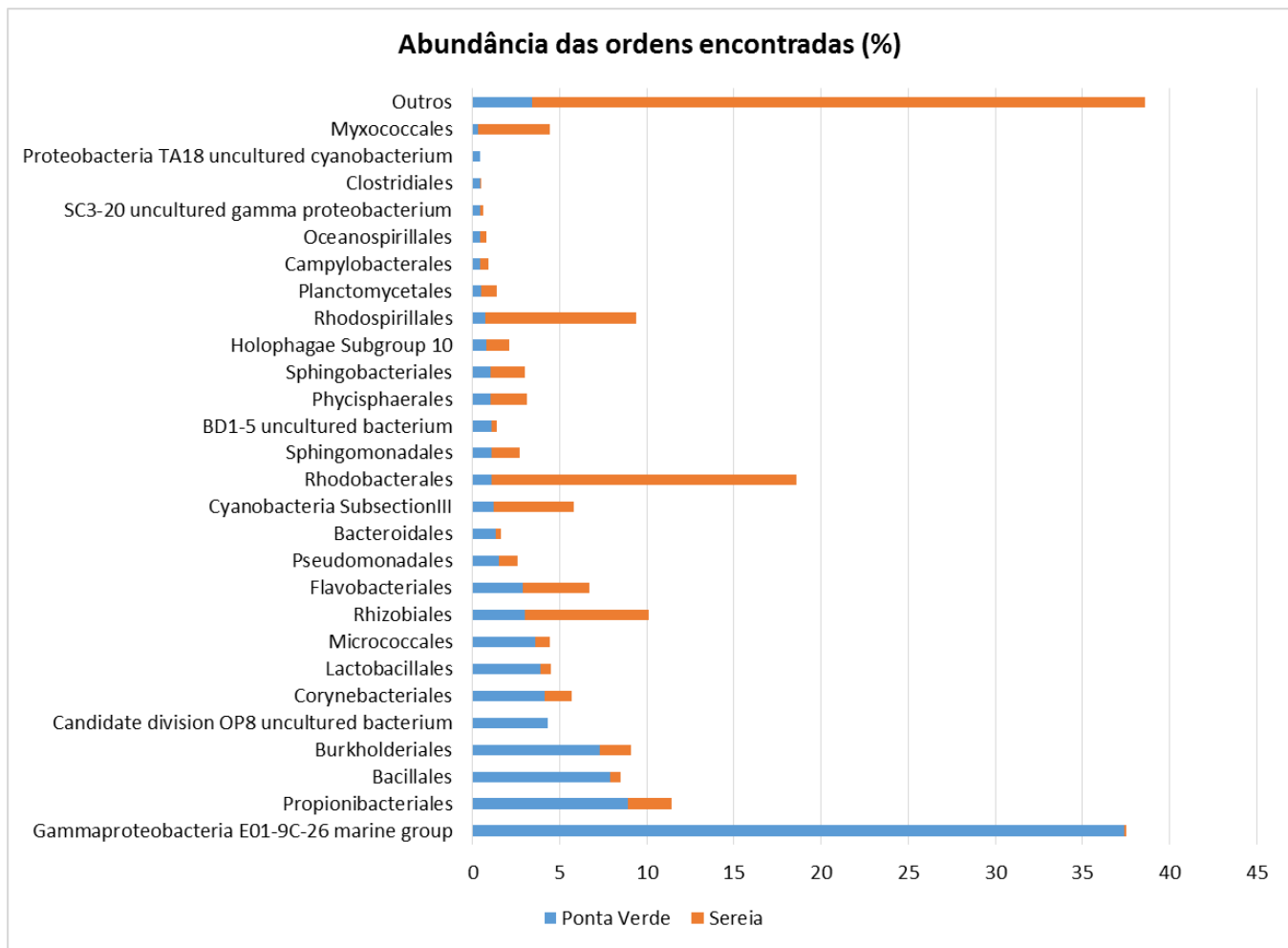


Fonte: Elaborado pelo autor.

À nível de ordem, 103 diferentes grupos foram encontrados, e novamente foi possível observar que diferentes táxons foram mais prevalentes em cada um dos dois pontos (Gráfico 4). O recife da Sereia exibiu uma alta prevalência de Rhodobacterales (17,5%). Duas outras ordens, Rhodospirillales (8,7%) e Rhizobiales (7,1%), também exibiram uma abundância significativa. Na Ponta Verde, o grupo marinho E01-9C-26 foi

a ordem dominante (37,4%), seguido por Propionibacteriales (8,9%), Bacillales (7,9%) e Burkholderiales (7,3%).

Gráfico 4: Abundância das principais ordens de bactérias associadas com as amostras de *Palythoa caribaeorum* coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.



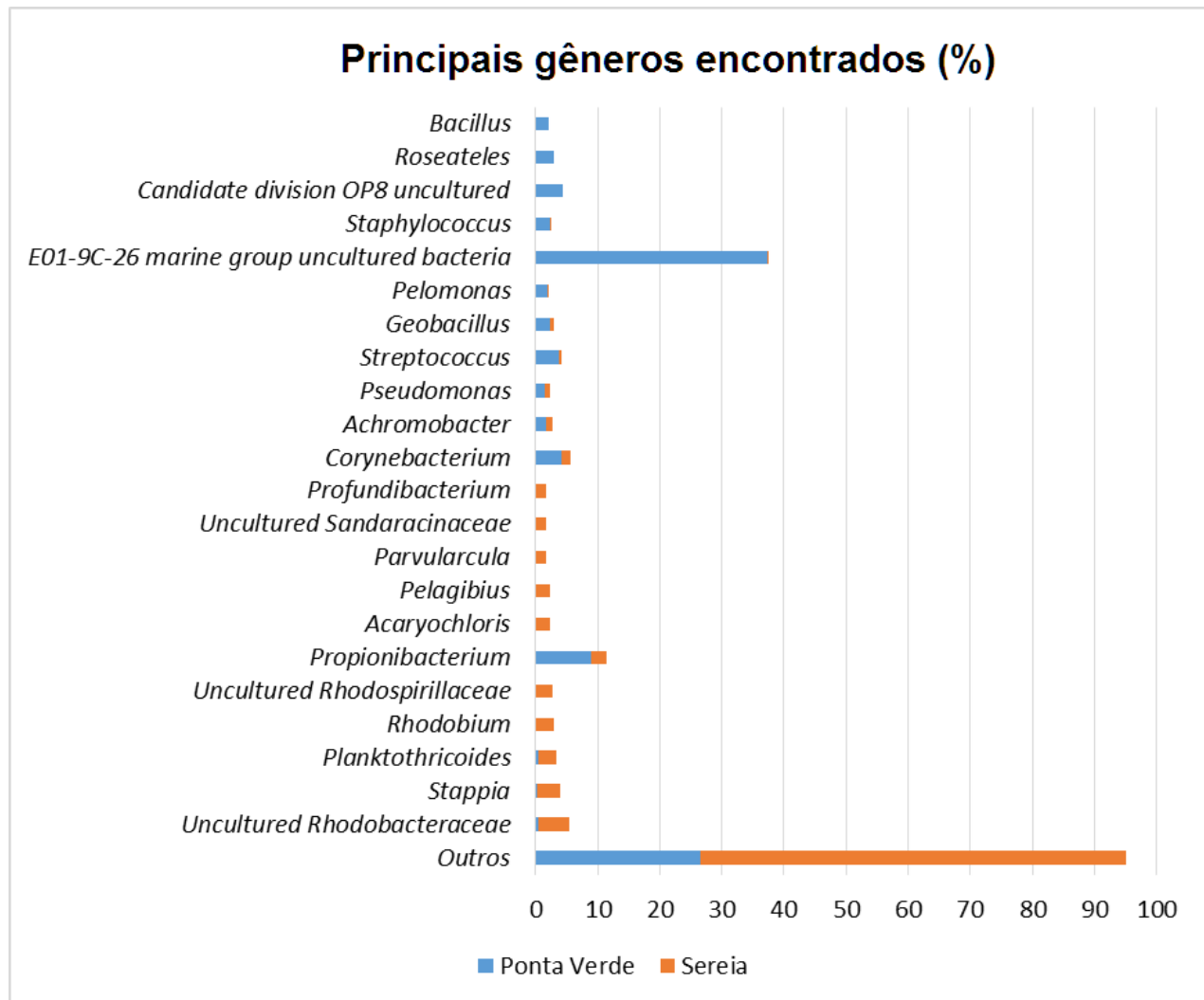
Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente, as sequências foram identificadas a nível de família, resultando em um total de 151 grupos nos dois locais. Rhodobacteraceae (17,4%) foi o grupo mais

abundante no recife da Sereia, seguida por Rhodospirillaceae (7,5%) e Rhodobiaceae (4,3%). Na praia Ponta Verde, um grupo de bactérias ainda não-cultivadas pertencente ao grupo marinho E01-9C-26 (43%) representou a família mais abundante, seguido por Propionibacteriaceae (8,9%), Comamonadaceae (5,6%), Bacillaceae (4,4%), Corynebacteriaceae (4,1%) e Streptococcaceae (3,7%).

Em seguida, a classificação taxonômica das sequências resultou na identificação de 256 gêneros (Gráfico 5). Nesse caso, 169 gêneros foram exclusivos do recife da Sereia, enquanto 39 ocorreram apenas na Ponta Verde e 48 foram compartilhados entre os dois pontos. Uma bactéria não cultivável pertencente ao grupo marinho E01-9C-26 (37,4%) foi o gênero mais prevalente na Ponta Verde, seguido por *Propionibacterium* (8,9%), outra bactéria não cultivada pertencente a divisão candidata TM7 (4,3%) e *Corinebacterium* (4,1%). No recife da Sereia pudemos observar uma microbiota composicionalmente mais semelhante, com mais amostras compartilhando os mesmos táxons. Uma Rhodobacteraceae não-cultivável (5%) representou o gênero mais prevalente, seguido por *Stappia* (3,7%), *Rhodobium* e *Planktothricoides* (2,9% das sequências cada), e *Acaryochloris* (2,4%).

Gráfico 5: Abundância dos principais gêneros de bactérias associadas com as amostras de *Palythoa caribaeorum* coletadas nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.



Fonte: Elaborado pelo autor

Apesar da ampla distribuição e importância ecológica do gênero *Palythoa*, poucos trabalhos até então exploraram a microbiota associada a outras espécies desses zoantídeos, e o que foi encontrado indica que cada espécie apresenta uma microbiota distinta, principalmente em termos de dominância dos principais grupos bacterianos

encontrados, sendo importante analisar a comunidade em todos os níveis taxonômicos para melhor comparação. A análise de sequências obtidas a partir de amostras do muco de *P. caribaeorum*, coletadas em dois pontos brasileiros, São Sebastião e Búzios, mostraram que Proteobacteria, mais especificamente a classe Gammaproteobacteria, foi o grupo mais representativo dentre as sequências obtidas. Além disso, a comunidade microbiana pareceu ser estável e resistente às variações sazonais, não sofrendo também influência da localização geográfica (Carlos *et al.*, 2013). Trabalhando com o pirosequenciamento de amostras de *P. australiae* coletadas no sul da China, Sun e colaboradores (Sun *et al.*, 2014) encontraram 22 filos bacterianos, sendo Proteobacteria o filo mais abundante, representando 58,6% do total das sequências obtidas, seguido por Chloroflexi (12%), Actinobacteria (10,2%) e Acidobacteria (6,2%). Em outro estudo, esse na área mexicana do mar do Caribe, Acidobacteria dominou a comunidade bacteriana associada a *Palythoa* sp., e junto com Proteobacteria representaram cerca de 2/3 das sequências obtidas, enquanto Chloroflexi foi o terceiro filo mais abundante (O'connor-Sánchez *et al.*, 2014). Com exceções, o filo Proteobacteria tende a ser o grupo dominante da comunidade bacteriana associada a esses corais, entretanto, a representatividade de outros grupos, como Actinobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi, é bastante variável. Além disso, esses resultados estendem para os zoantídeos o que já é dito em estudos anteriores, que espécies diferentes de coral possuem comunidades bacterianas distintas e aparentemente específicas em condições normais (Rohwer *et al.*, 2001; Frias-Lopez *et al.*, 2002; Rohwer *et al.*, 2002; Bourne e Munn, 2005).

As bactérias, junto com outros micro-organismos, desempenham importantes funções que contribuem para a saúde do coral hospedeiro, sendo possível atribuir um papel ecológico potencial para essas bactérias através de dados prévios encontrados na literatura (Tabela 2). O grupo Actinobacteria pode ser encontrado associado à diversas fontes biológicas, tais como peixes, moluscos e esponjas (Dharmaraj, 2010), sendo aceito como onipresente em corais e conhecido por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, incluindo vários compostos com atividade antibacteriana provavelmente responsáveis por desempenhar um papel na defesa química do

hospedeiro (Khan, 2010; Kuang *et al.*, 2015). Neste estudo, 17 gêneros desse filo foram encontrados, sendo oito classificados como não-cultivados. Cianobactérias são conhecidas pelo papel na fixação de nitrogênio e na translocação para o hospedeiro dos produtos resultantes do processo oxi-fotossintético, contribuindo para sua nutrição. Alphaproteobacteria constitui um dos principais grupos dominantes encontrados em associação com corais (Mckew *et al.*, 2012; Michelou *et al.*, 2013). Pesquisas filogenéticas anteriores demonstram que, junto com Gammaproteobacteria e Cyanobacteria, estes três grupos aparentam ser residentes simbiotes dominantes associados à corais (Bourne *et al.*, 2016). Além de Cyanobacteria, outros táxons conhecidos por seu papel na ciclagem de nitrogênio e realização da fotossíntese foram encontrados em associação à *P. caribaeorum*. Chlorobi e Chloroflexi são dois filos de bactérias fotossintetizantes previamente encontradas em associação com outras espécies de coral, e sugere-se um papel na nutrição do hospedeiro através da translocação de parte dos produtos produzidos no processo. O grupo Rhizobiales é previamente conhecido por ser um fixador de nitrogênio comumente associado a diversas espécies de cnidários (Rådecker *et al.*, 2015), incluindo outro zoantídeo, *P. australiae* (Sun *et al.*, 2014). Burkholderiales possui membros associados com a fixação de N₂ e degradação de poluentes (Morrow *et al.*, 2012), incluindo a família Comamonadaceae, cujo papel na desnitrificação e ciclagem de enxofre já foi mostrado (Schmalenberger *et al.*, 2008). Além dos grupos comensais ou mutualistas, foi possível observar a presença de táxons relacionados à patogenias de corais. Por exemplo, Rhodobacterales é uma ordem de bactérias associada à *White Plague Disease*, uma doença que afeta corais (Cardenas *et al.*, 2012; Morrow *et al.*, 2012). O grupo Rhodobacteraceae é conhecido como um agente patogênico oportunista de corais, associado à doença *White Plague* (Roder *et al.*, 2014).

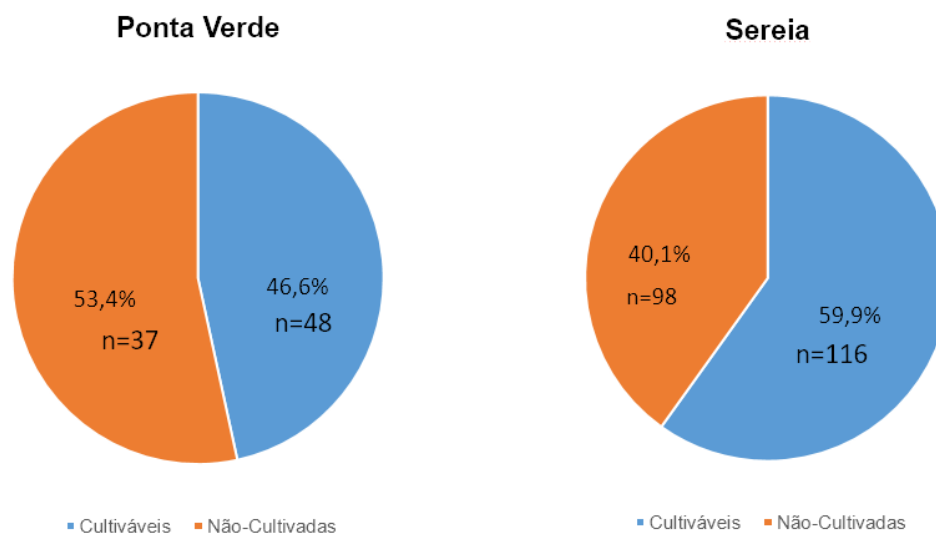
Tabela 2: Potenciais papéis ecológicos de alguns dos grupos bacterianos encontrados em associação a *Palythoa caribaeorum*, atribuídos com base na literatura.

Grupo	Potencial papel em associação ao coral	Ponta Verde (%)	Sereia (%)
Chlorobi	Fotossíntese e fixação de nitrogênio	0.0	0.1
Chloroflexi	Fotossíntese e liberação de produtos de carbono.	0.4	1.7
Cyanobacteria	Fotossíntese e fixação de N ₂	1.5	9.8
Nitrospira	Fixação de N ₂	0.0	0.7
Rhizobiales	Fixação de N ₂	3.0	7.1
Rhodobium	Fixação de N ₂	0.0	2.9
Acidobacteria	Redução de nitrato e nitrito	0.8	2.3
Actinobacteria	Liberação de compostos antimicrobianos	17.2	7.0
Planctomycetes	Degradadores de polímeros carbônicos sulfatados	1.6	5.5
Proteobacteria	Principais constituintes de corais	55.1	59.8
Bacteroidetes	Degradação da matéria orgânica complexa na biosfera, especialmente sob a forma de polissacáridos e proteínas	5.5	9.0
Firmicutes	Principais constituintes de corais/Nesse caso, possíveis membros da microbiota humana	12.4	1.8

Ambos os pontos apresentaram uma grande quantidade de micro-organismos classificados como “não-cultivados”, indicando que grande parte da microbiota associada ao *P. caribaeorum* ainda é desconhecida (Gráfico 6). Nesse ponto, o recife da Sereia apresentou uma maior diversidade dessas bactérias, com 98 grupos classificados como “não-cultivados” (cerca de 40,1% do total), enquanto que no recife da Ponta Verde

esse número foi reduzido para 37, equivalendo à 53,4% do total de grupos encontrados. Esse dados refletem o vasto potencial biotecnológico que há para ser explorado no ambiente marinho, pois provavelmente vários novos compostos estão associados a essa diversidade ainda não conhecida.

Gráfico 6: Número de OTU's classificados como não-cultivados encontrados dentre as sequências de bactérias associadas ao coral *Palythoa caribaeorum* coletados nos recifes da Ponta Verde e da Sereia.



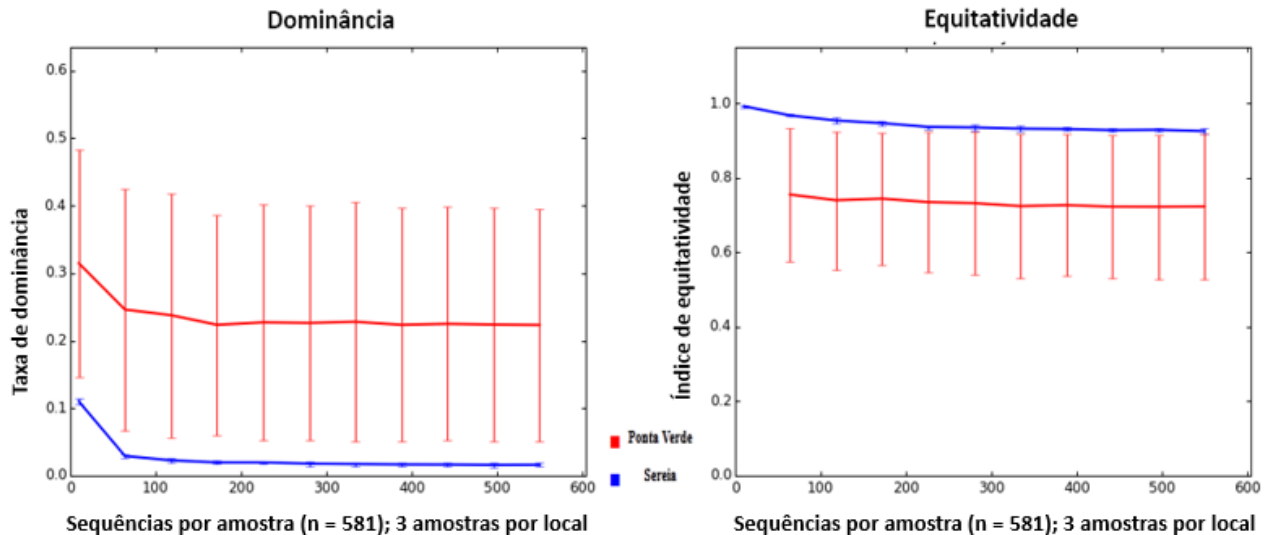
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Análises de Diversidade

Análises de Alfa (α) e Beta (β) diversidade foram realizadas após rarefação das amostras de acordo com a menor biblioteca de sequências encontrado dentre as amostras (581, pertencente a uma das amostras coletadas na Ponta Verde). A taxa de cobertura variou entre 98,7% no recife da Ponta Verde e 93,3% no recife da Sereia, sugerindo que o esforço amostral foi suficiente para conseguir representar a microbiota associada à *P. caribaeorum* praticamente em sua totalidade. De acordo com o valor do índice de Shannon (H'), uma maior diversidade de OTU's foi encontrada no recife da

Sereia ($H' = 6,5$) do que a encontrada na Ponta Verde ($H' = 3,35$). Cinco das seis amostras exibiram uma baixa dominância e altos índices de equitabilidade entre as comunidades bacterianas associadas (Gráfico 7).

Gráfico 7: Média dos índices de dominância e equitabilidade observados nas comunidades bacterianas nos recifes da Ponta verde e Sereia.



Fonte: Elaborado pelo autor.

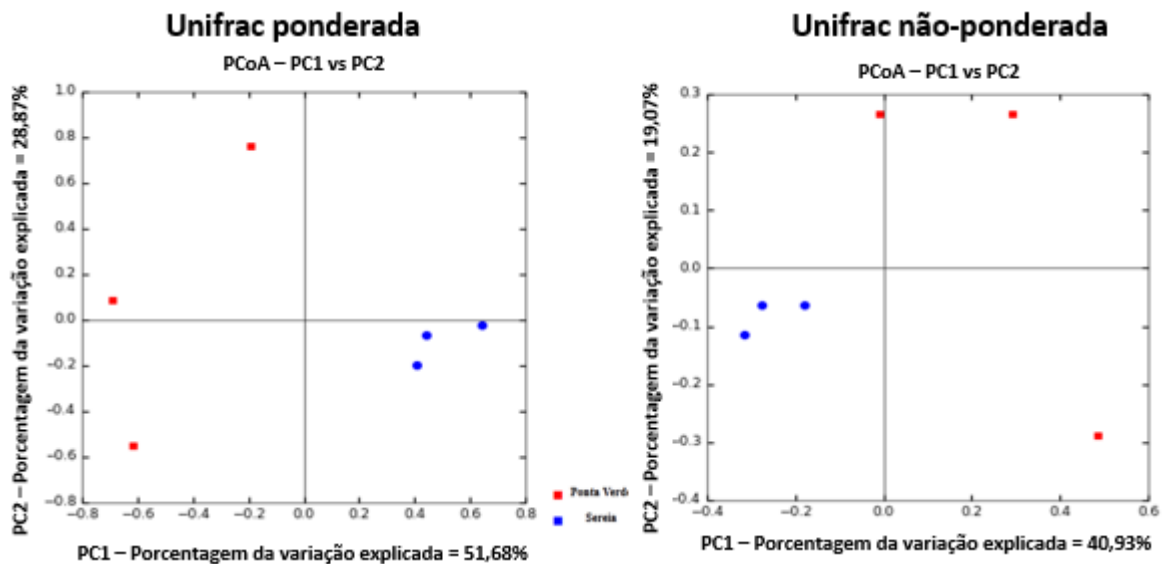
Relacionando os dados, notamos nos corais localizados na Ponta Verde uma comunidade bacteriana compreendendo menos OTU's e uma maior dominância do que o recife da Sereia (Fig. 5), o que pode ser relacionado com a presença mais abundante no local de grupos associados a patogenias em humanos. Além de conter menos OTU's, a microbiota das amostras coletadas no recife da Ponta Verde contiveram uma proporção elevada de grupos associados com doenças humanas entre os gêneros mais abundantes: *Propionibacterium* (8,9%), *Corynebacterium* (4,9%), *Streptococcus* (3,9%), *Staphylococcus* (2,4 %), *Bacillus* (2,1%) e *Pseudomonas* (1,5%). Além disso, o número de OTU's compartilhados entre os recifes foi relativamente baixo, sendo apenas 3 OTU's. Também foram encontrados OTU's que parecem ser específicos de cada local

de coleta. Na praia de Sereia, as 3 amostras compartilharam entre si 21 OTU's, com a maioria das sequências (158) pertencentes aos gêneros *Propionibacterium*, enquanto na Ponta Verde apenas três OTU's, sendo duas das quais classificadas como *Propionibacterium* e um como *Staphylococcus*, estavam presentes em todas as três amostras analisadas. Estudos anteriores demonstraram uma relação espécie-específica entre algumas espécies de bactérias e seus corais hospedeiros, incluindo alguns grupos de bactérias e o muco do *P. caribaeorum* (Carlos *et al.*, 2013). A presença de grupos potencialmente patogênicos para humanos dominando a microbiota do recife de Ponta Verde é um forte indicativo de um desequilíbrio na composição da comunidade bacteriana ao que tudo indica causado pelo aporte de matéria orgânica no ambiente, agravado principalmente nos períodos de chuva. Já foi demonstrado que corais saudáveis tendem a apresentar uma maior diversidade e heterogeneidade, enquanto a diversidade microbiana tende a diminuir em corais doentes (De Castro *et al.*, 2010; Cardenas, 2012; Kellogg *et al.*, 2013). Em condições ideais, há a predominância de relações mutualísticas e comensais, porém, durante o estresse, há uma perturbação dessas relações e a microbiota muda de benigna e/ou benéfica para estresse-resistente, potencialmente patogênica e oportunista. Um aumento em bactérias e fungos associados com doenças em animais tem sido notado anteriormente em corais em aquários submetidos a pH reduzido, temperaturas elevadas e maiores níveis de nutrientes (Thurber *et al.*, 2009). Apesar de aparentemente saudáveis, é possível que as amostras coletadas de *P. caribaeorum* coletadas no recife de coral da Ponta Verde esteja passando por mudanças na composição da microbiota que possam estar associadas com o adoecimento desses corais, além de estarem atuando como possíveis reservatórios para várias bactérias patogênicas de humanos.

As diferenças entre as comunidades bacterianas associadas a cada coral foram avaliadas com uso do software QIIME usando as métricas UniFrac não-ponderadas e ponderadas. A análise de coordenadas principais (PCoA) da matriz de distância UniFrac (Gráfico 8) facilmente distingue entre as comunidades bacterianas de dois locais,

demonstrando uma maior similaridade entre as microbiotas das amostras coletadas no recife da Sereia do que na Ponta Verde.

Gráfico 8: Análise de Coordenadas Principais (PcoA) da matriz de distância UniFrac de forma ponderada e não-ponderada das comunidade bacterianas associadas as amostras de *Palythoa caribaeorum* obtidas nos recifes da Ponta Verde e Sereia.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os fatores ambientais observados no trabalho, a introdução de matéria orgânica na praia de Ponta Verde devido a descarga de esgoto, e que pode ser justificada pela maior contagem de coliformes termotolerantes nesta região, aparenta ser o principal agente afetando a composição da microbiota dos corais analisados. Em um estudo semelhante, realizado ao longo de um gradiente de poluição proveniente da ocupação urbana da costa de Jeddah – Arábia Saudita com amostras de duas espécies de corais escleractíneos, *Pocillopora verrucosa* e *Acropora hemprichii*, revelou que em ambos os corais os principais táxons associados encontrados em um ambiente não impactado diminuíram em abundância quando comparado com um ambiente afetado por

descarga de esgoto, onde também foi possível observar um aumento da presença de grupos oportunistas e potenciais patógenos (Ziegler *et al.*, 2016). Diferenças entre comunidades bacterianas associadas a corais também foram observadas entre amostras de *Montastraea annularis* coletadas em diferentes pontos de Curaçao, principalmente em águas mais rasas e expostas a poluentes de origem urbana (Klaus *et al.*, 2007). A microbiota de diferentes espécies de corais coletadas no Mar Vermelho apresentou maior semelhança entre si em amostradas coletadas em regiões que recebem continuamente descarga de esgoto de fontes antropogênicas e domésticas ao longo de seus dois lados (Lee *et al.*, 2012). Em outro caso, com amostras de diferentes espécies de coral coletadas em quatro pontos da China, indicaram que as comunidades bacterianas de um local mais influenciado por atividades humanas foram significativamente diferentes dos demais pontos. Neste caso, os autores propõem que os resultados corroboram com a hipótese probiótica (Zaneveld *et al.*, 2015). O aumento da urbanização junto com as populações humanas acarretam consequências duradouras aos ecossistemas costeiros (Wu *et al.*, 2010). Estressores ambientais que alteram a fisiologia do hospedeiro também afetam a microbiota associada, e mudanças na diversidade microbiana têm sido relacionadas com a proximidade dos corais a populações humanas (Morrow *et al.* 2012). Uma vez que estas mudanças ocorrem dentro do coral hospedeiro resposta a pressões do ambiente, as interações hospedeiro micro-organismos também poderão ser alteradas (Ainsworth *et al.*, 2010).

6. Considerações finais

O recife da Ponta Verde está localizado dentro de uma área urbana e sofre com despejo de esgoto constante ao longo de sua costa, e a abordagem utilizada por agências governamentais para monitorar seu impacto é a contagem de coliformes termotolerantes. Este método sofre com algumas restrições, como a flutuação temporal e biodegradação rápida em ambientes marinhos tropicais, além de ignorar diversos outros grupos bacterianos possivelmente prejudiciais aos corais, como os encontrados graças a aplicação da metagenômica neste trabalho, o que torna difícil avaliar e quantificar o impacto das alterações da qualidade da água na saúde dos ecossistemas marinhos (Kriwy e Uthicke, 2011) e como ela influencia a microbiota associada ao coral. Ambos os recifes apresentaram um grande número de bactérias classificadas como ainda não-cultivadas, tornando esses corais uma potencial fonte para novas espécies e compostos bioativos. A presença em alta abundância de diferentes gêneros associados à doenças humanas é uma forte evidência de que despejo de esgoto não tratado pode ter alterado a composição das comunidades bacterianas associadas com *P. caribaeorum*, tornando os corais possíveis reservatórios desses grupos bacterianos. Em segundo lugar, trabalhos anteriores reforçam a ideia de que o sedimento possui uma ampla gama de bactérias associadas e pode influenciar a composição da microbiota associada com organismos bentônicos, agindo como um "banco de sementes" para corais e um reservatório de patógenos oportunistas (Schttner, 2009; Carlos, Torres e Ottoboni, 2013). À medida que a composição dos recifes é diferente, isto pode ser um dos fatores que explicam as diferenças observadas entre as comunidades, entretanto, essa condição precisa ser melhor elucidada. Finalmente, sugere-se que o efeito das marés pode afetar a composição da microbiota de corais. O coral de arenito da praia da Sereia encontra-se mais elevado em relação ao nível do mar, ficando mais tempo exposto durante as marés baixas. Sua disposição horizontal em direção à praia também pode influenciar as mudanças rápidas da comunidade microbiana em relação ao estresse causado por variações ambientais diárias, conforme demonstrado em estudos

anteriores (Ainsworth, Thurber e Gates, 2010). Como todo o coral seria influenciado simultaneamente, a microbiota associada tenderia a tornar-se mais homogênea. O arranjo vertical do recife na Ponta Verde pode afetar o modo como os invertebrados são influenciados pelo efeito da maré, em conformidade com a profundidade que se encontram.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; AHMAD, F.; PITCHEL, J. Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications. **Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications**, p. 1--516, 2011. ISSN 9781441979308.

AINSWORTH *et al.* Coral disease diagnostics: What's between a plague and a band? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 981-992, 2007. ISSN 0099-2240

AINSWORTH, T. D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 4, p. 233-240, 2010. ISSN 0169-5347.

AMARAL, F. *et al.* Cnidarians of Saint Peter and St . Paul Archipelago, Northeast Brazil. *Atlantic*, v. 9, n. October, p. 567--572, 2000. ISSN 9798105974.

AMARAL, F. *et al.* Checklist and morphometry of benthic cnidarians from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 50, n. 3, p. 277--290, 2009. ISSN 0007-9723, 0007-9723

BAHARUM, S. N.; BENG, E. K.; MOKHTAR, M. Marine microorganisms: Potential application and challenges. *10*: 555-564 p. 2010.

BALZER *et al.* Characteristics of 454 pyrosequencing data-enabling realistic simulation with flowsim. *Bioinformatics*, v. 27, n. 13, p. i420-i425, 2011. ISSN 1367-4811

BAROTT, K. L.; ROHWER, F. L. Unseen players shape benthic competition on coral reefs. *20*: 621-628 p. 2012.

BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. Coral - The World's Most Diverse Symbiotic Ecosystem. **Molecular Ecology**, p. n/a-n/a, 2015.

BOMAR, L. *et al.* Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. **mBio**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2011. ISSN 10.1128/mBio.00012-11.

BOSCOLO, H. K.; SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 29-41, 2005. ISSN 1519-6984.

BOURNE, D. et al. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 350-363, 2008. ISSN 1751-7362

BOURNE, D. G.; MORROW, K. M.; WEBSTER, N. S. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. annurev-micro-102215-095440, 2016.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1162-1174, 2005.

BOUZON, J. BRANDINI, F.; ROCHA, R.; Biodiversity of Sessile Fauna on Rocky Shores of Coastal Islands in Santa Catarina, Southern Brazil. **Marine Science**, v. 2, n. 5, p. 39--47, 2012. ISSN 2163-243X.

BROWN, B. E.; BYTHELL, J. C. Perspectives on mucus secretion in reef corals. 296: 291-309 p. 2005.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2011.

CARDENAS, A. et al. Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. **Isme J**, v. 6, n. 3, p. 502-512, 2012. ISSN 1751-7370

CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific reports**, v. 3, p. 1624-1624, 2013.

CASE, R. J. et al. Use of 16S rDNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007. ISSN 0099-2240

CEDRO, V. R. et al. Demospongiae (Porifera) of the shallow coral reefs of Maceió , Alagoas State , Brazil. *Atlantic*, n. 1, p. 233-237, 2007.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007. ISSN 0167-7012

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. Ecosistemas Marinhos : recifes, praias e manguezais. **Edufal**, p. 55-55, 2005.

COSTANZA, R. The ecological, economic, and social importance of the oceans. **Ecological Economics**, v. 31, p. 15, 1999.

DAVID, I. K. et al. Role of elevated organic carbon levels and microbial activity in coral mortality. **Marine Ecology Progress Series**, v. 314, p. 119-125, 2006.

DAVIDSON, O. G. The enchanted braid. Coming to the terms with nature on the Coral Reef. New York: **John Wiley & Sons Inc**, 1998. 269 p.

DE CASTRO, A. P. et al. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Microb Ecol**, v. 59, n. 4, p. 658-67, May 2010. ISSN 0095-3628.

DE SANTANA, E. F. C. et al. Trophic ecology of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, n. 02, p. 301-309, 2014.

DELONG, E. F. Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. **Trends Biotechnol**, v. 15, n. 6, p. 203-7, Jun 1997. ISSN 0167-7799.

DHARMARAJ, S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2123--2139, 2010. ISSN 0959-3993

DIVERSITY, S. O. T. C. O. B. Global Biodiversity Outlook 4. 2010. 88 ISBN 929225040X

DUCKLOW, H. W.; MITCHELL, R. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. **Limnology and Oceanography**, v. 24, n. 4, p. 715-725, 1979. ISSN 00243590.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011. ISSN 1367-4803.

FRIAS-LOPEZ, J. et al. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2214-2228, 2002. ISSN 0099-2240.

FUHRMAN, J. A.; CRAM, J. A.; NEEDHAM, D. M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 133-46, Mar 2015. ISSN 1740-1534.

GARREN, M.; AZAM, F. New directions in coral reef microbial ecology. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 833-844, 2012. ISSN 1462-2920.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 3, n. 1740-1526 (Print), p. 733-739, 2005. ISSN 1740-1526

GILLES, A. et al. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. **BMC genomics**, v. 12, p. 245-245, 2011. ISSN 1471-2164

GLEIBS, S.; MEBS, D.; WERDING, B. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1531-1537, 1995. ISSN 0041-0101.

HABERMANN, E.; CHHATWAL, G. S. Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 319, n. 2, p. 101-107, 1982.

HADFIELD, M. G. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 453-470, 2011. ISSN 1941-1405\n978-0-8243-4503-7.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms*. v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998. ISSN 1074-5521 (Print).

HARVELL, C. D. et al. Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. **Science**, v. 285, n. 5433, p. 1505-1510, 1999. ISSN 0036-8075.

HUSE, S. M.; WELCH, D. B. M. Accuracy and Quality of Massively Parallel DNA Pyrosequencing. In: (Ed.), 2011. p.149-155. ISBN 9780470644799.

IBGE. Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil. 2011. 177-177 ISBN 9788524042195.

INSEL, C. Z. D. et al. Cnidarian Zonation at Ilha do Sal (Arquipélago de Cabo Verde). **Beiträge zur Paläontologie**, v. 20, p. 41-49, 1995.

KELLOGG, C. A. et al. Comparing bacterial community composition between healthy and white plague-like disease states in *Orbicella annularis* using PhyloChip G3 microarrays. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79801, 2013. ISSN 1932-6203.

KEMP, D. W. et al. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 335, n. 2, p. 266-276, 2006. ISSN 0022-0981.

KHAN, S.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Diversity, salt requirement, and antibiotic production of Actinobacteria isolated from marine sponges. **Actinomycetologica**, v. 24, n. 1, p. 18--23, 2010. ISSN 0914-5818.

KLAUS, J. S. et al. Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1291-1305, 2007. ISSN 1462-2912.

KNOWLTON, N.; JACKSON, J. C. The Ecology of Coral Reefs. Darwin, v. 3, n. Paulay 1997, p. 395-422, 1999. ISSN 0878930574.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1929-1940, 2006. ISSN 0962-8436.

KRIWY, P.; UTHICKE, S. Microbial diversity in marine biofilms along a water quality gradient on the Great Barrier Reef. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 2, p. 116-26, 2011. ISSN 0723-2020.

KUANG, W. et al. Diversity and distribution of Actinobacteria associated with reef coral *Porites lutea*. 6 2015.

LALLI, C. et al. Biological Oceanography an Introduction. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689--1699, 2013. ISSN 9788578110796

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 13, p. 4972-4972, 1986. ISSN 0027-8424

LAZCANO-PÉREZ, F. et al. A purified *Palythoa* venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. **Toxicon**, v. 82, p. 112-116, 2014. ISSN 0041-0101.

LEE, O. et al. Spatial and species variations in bacterial communities associated with corals from the Red Sea as revealed by pyrosequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7173-7184, OCT 2012 2012. ISSN 0099-2240.

LESSER, M. P. et al. Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 346, n. 1-2, p. 36-44, 2007. ISSN 0022-0981.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

MARSH, S. Pyrosequencing applications. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 373, n. 3, p. 15-24, 2007. ISSN 1064-3745 (Print)\r1064-3745 (Linking).

MCFADDEN, C. S.; COLLINS, A. G. The Phylum Cnidaria : A Review of Phylogenetic Patterns and Diversity 300 Years After Linnaeus. v. 182, p. 127-182, 2007.

MCKEW, B. A. et al. Characterization of geographically distinct bacterial communities associated with coral mucus produced by *Acropora* spp. and *Porites* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5229-5237, 2012. ISSN 0099-2240.

MICHELOU, V. K. et al. The Ecology of Microbial Communities Associated with *Macrocytis pyrifera*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013. ISSN 1932-6203

MOBERG, F. F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological Economics**, v. 29, n. 2, p. 215-233, 1999. ISSN 0921-8009.

MORROW, K. M. et al. Bacterial associates of two caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6438-6449, 2012. ISSN 1098-5336

MOURA, R. L. Brazilian reefs as priority areas for biodiversity conservation in the Atlantic Ocean. 9th **International Coral Reef Symposium**, v. 2, n. October, p. 917--920, 2000. ISSN 9798105974.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993. ISSN 0099-2240.

NEILL, M. Microbiological Indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. **Mar Pollut Bull**, v. 49, n. 9-10, p. 752-60, Nov 2004. ISSN 0025-326X

NELSON, C. E. et al. Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 962-79, 2013. ISSN 1751-7362.

NYRÉN, P. Enzymatic method for continuous monitoring of {DNA} polymerase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 167, n. 2, p. 235-238, 1987.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A. et al. Acidobacteria appear to dominate the microbiome of two sympatric Caribbean Sponges and one Zoanthid. **Biological research**, v. 47, n. 1, p. 67-67, 2014.

PANDOLFI, J. et al. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. **Science**, v. 301, n. 5635, p. 955-958, AUG 15 2003 2003. ISSN 0036-8075.

PANTOS, O. et al. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 370-382, 2003. ISSN 1462-2912.

PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. 55: 856-866 p. 2009.

POST, C. W. Is There a Relationship between Proximity to Sewage Effluent and the Prevalence of Coral Disease ? **Caribbean Journal of Science**, v. 41, n. 1, p. 124--137, 2005.

PRICE, M.; DEHAL, P.; ARKIN, A. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641-1650, JUL 2009 2009. ISSN 0737-4038.

PRUESSE, E. et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188-7196, DEC 2007 2007. ISSN 0305-1048.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30-7, 2014.

PÉREZ, C. D.; VILA-NOVA, D. A.; SANTOS, A. M. Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Anthozoa) from littoral of Pernambuco, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 548, n. 1, p. 207-215, 2005. ISSN 0018-8158, 0018-8158.

QUAIL, M. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-1, 2012. ISSN 1471-2164.

REIMER, J. D.; FOORD, C.; IREI, Y. Species Diversity of Shallow Water Zoanths (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) in Florida. **Journal of Marine Biology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

REIMER, J. D. et al. Distribution of zooxanthellate zoanthid species (Zoantharia: ANthozoa: Hexacorallia) in southern Japan limited by cold temperatures. Galaxea, **Journal of Coral Reef Studies**, v. 10, n. 2, p. 57-67, 2008.

REIMER, J.; HIROSE, M.; WIRTZ, P. Zoanths of the Cape Verde Islands and their symbionts: previously unexamined diversity in the Northeastern Atlantic. **Contributions to Zoology**, v. 79, n. 4, p. 147--163, 2010. ISSN 1383-4517.

REIS, A. et al. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378--1387, 2009. ISSN 1365-2672.

REOPANICHKUL, P. et al. Sewage impacts coral reefs at multiple levels of ecological organization. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 9, p. 1356-1362, 2009.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual review of genetics**, v. 38, p. 525-552, 2004. ISSN 0066-4197.

RINCON-FLOREZ; CARVALHAIS, V. A.; SCHENK, L. C. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, n. 3, p. 581--612, 2013. ISSN 1424-2818

RITCHIE, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 322, p. 1-14, September 20, 2006 2006.

RODER, C. et al. Bacterial profiling of White Plague Disease in a comparative coral species framework. **The ISME Journal**, v. 8, n. 1, p. 31-39, 2014.

ROGERS, Y.-H.; AND VENTER, J. C. Genomics: Massively parallel sequencing. **Nature**, v. 437, n. 437, p. 326 -- 327, 2005. ISSN 1095-9203.

ROHWER, F. et al. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. **Coral Reefs**, v. 20, n. 1, p. 85-91, 2001. ISSN 0722-4028.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. n. 650, p. 3--11, 2001.

ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature reviews in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 355-362, 2007. ISSN 1740-1526.

RÄDECKER, N. et al. Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 1-8, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. ISSN 0027-8424.

SANTOS, M. E. A. et al. Overview of the order Zoantharia (Cnidaria: Anthozoa) in Brazil. **Marine Biodiversity**, 2015. ISSN 1867-1616 1867-1624.

SHARP, K. H.; RITCHIE, K. B. Coral-associated bacterial communities in the face of global climate change. **Biological Bulletin** 223(1): 66-77, 2012.

SCHMALENBERGER, A. et al. The role of Variovorax and other Comamonadaceae in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1486-500, 2008. ISSN 1462-2912.

SEBENS, K. P. Intertidal distribution of Zoanthids on the Caribbean Coast of Panamá: Effects of predation and desiccation. **Bulletin of Marine Science**, v. 32, n. 1, p. 316-335, 1982. ISSN 0007-4977.

SEEMANN, P. et al. Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 405-411, 2009. ISSN 0003-6072.

SHARP, K. H.; RITCHIE, K.B. Multi-partner interactions in corals in the face of climate change. 223: 66--77 p. 2012.

SILVA, J. et al. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 985-996, JUN 2015 2015. ISSN 0001-3765.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011. ISSN 1098-5336.

SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å. Oligotrophic Bacterioplankton with a Novel Single-Cell Life Strategy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2445-2451, 2004. ISSN 0099-2240.

SINNIGER, F. et al. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. **Marine Biology**, v. 147, n. 5, p. 1121-1128, 2005. ISSN 4122379679.

SOARES, C. L. S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006.

SOGIN, M. L.; WELCH, D. B. M.; HUSE, S. M. Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored "Rare Biosphere". **Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats**, n. 30, p. 243-252, 2011. ISSN 9780470647196.

STABILI, L.; TERLIZZI, A.; CAVALLO, R. A. Sewage-exposed marine invertebrates: survival rates and microbiological accumulation. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 20, n. 3, p. 1606-16, Mar 2013. ISSN 0944-1344.

SUN, W. et al. Pyrosequencing Reveals Diverse Microbial Community Associated with the Zoanthid *Palythoa australiae* from the South China Sea. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 4, p. 942-950, 2014.

SWEET, M. J.; CROQUER, A.; BYTHELL, J. C. Bacterial assemblages differ between compartments within the coral holobiont. **Coral Reefs**, v. 30, n. 1, p. 39-52, 2011.

THURBER, R. et al. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 2148-2163, AUG 2009 2009. ISSN 1462-2912.

TREMBLAY, P. et al. Mucus composition and bacterial communities associated with the tissue and skeleton of three scleractinian corals maintained under culture conditions. **J Mar Biol Assoc U. K.**, v. 91, n. 03, p. 649-657, 2011. ISSN 0025-3154.

TSENG, C. H.; TANG, S. L. Marine microbial metagenomics: From individual to the environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8878-8892, 2014. ISSN 1422-0067.

ULSTRUP, K. E. et al. Intra-colonial variability in light acclimation of zooxanthellae in coral tissues of *Pocillopora damicornis*. **Marine Biology**, v. 149, n. 6, p. 1325-1335, 2006. ISSN 0025-3162.

VERMEIJ, M. J. A. et al. Survival and settlement success of coral planulae: Independent and synergistic effects of macroalgae and microbes. **Oecologia**, v. 159, n. 2, p. 325-336, 2009. ISSN 1432-1939 (Electronic)\r0029-8549 (Linking).

VEZZULLI, L. et al. 16SrDNA Pyrosequencing of the Mediterranean Gorgonian *Paramuricea clavata* Reveals a Link among Alterations in Bacterial Holobiont Members, Anthropogenic Influence and Disease Outbreaks. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013. ISSN 1932-6203.

WEAR, S. L.; THURBER, R. V. Sewage pollution: Mitigation is key for coral reef stewardship. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1355, n. 1, p. 15-30, 2015.

WILKINSON, C. S. Status of Coral Reefs of the World : 2004. **Coral Reefs**, v. 2, p. 378-378, 2004. ISSN 0642322090.

WIRTZ, et al. Crustaceans associated with Cnidaria, Bivalvia, Echinoidea and Pisces at S\~ a o Tom \ ' e and Pr \ ' i ncipe islands. Arquip \ ' e lago. **Life and Marine Sciences**, v. 25, p. 63--69, 2008.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution Background. **Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987. ISSN 0146-0749.

WU, C. H. et al. Characterization of coastal urban watershed bacterial communities leads to alternative community-based indicators. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11285-e11285, 2010. ISSN 1932-6203.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: Concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713-1731, 2006. ISSN 1905522606.

ZANEVELD, J. R. et al. The diversity of coral associated bacteria and the environmental factors affect their community variation. **Ecotoxicology**, v. 34, n. 4, p. 1467-1477, 2015. ISSN 0722-4028.

ZIEGLER, M. et al. Coral microbial community dynamics in response to anthropogenic impacts near a major city in the central Red Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, n. 2, p. 629-640, 2016.

Parte 2: Artigos científicos

**ARTIGO 1: Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral
Palythoa caribaeorum due to anthropogenic effects**



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral *Palythoa caribaeorum* due to anthropogenic effects

Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino ^{a,1}, Leonardo Broetto ^{b,1}, Victor Satler Pylro ^c, Melissa Fontes Landell ^{d,*}

^a Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP 57072-900 Maceió, AL, Brazil

^b Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, CEP 57309-005 Arapiraca, AL, Brazil

^c René Rachou Research Center (CPqRR-FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP 57072-900 Maceió, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2016

Received in revised form 10 October 2016

Accepted 18 November 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Cnidarian

Organic matter

Environmental effect

Next generation sequencing

Microbial community

Sewage dumping

ABSTRACT

Corals harbor abundant and diverse prokaryotic communities that may be strongly influenced by human activities, which in turn compromise the normal functioning of coral species and predispose them to opportunistic infections. In this study, we investigated the effect of sewage dumping on the bacterial communities associated with the soft coral *Palythoa caribaeorum* at two sites in the Brazilian coast. We observed a dominance of bacterial species classified as human pathogens at sites exposed to untreated sewage discharge. The microbial diversity of undisturbed sites was more homogeneous and diverse and showed greater abundance. In addition, bacterial communities differed substantially between the exposed and undisturbed areas. The microbial community associated with the samples collected from the exposed sites revealed the anthropogenic effect caused by organic matter from untreated sewage dumping, with an abundance of pathogenic bacterial species.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Corals of the Zoantharia order is particularly common in tropical and subtropical regions, where they constitute the most abundant benthic component of coral reefs. They belong to the class Anthozoa and subclass Hexacorallia and are sessile marine cnidarians. Because most species are colonial and lack skeleton, the taxon is often considered as an intermediate between hard corals (Scleractinia) and sea anemones (Actiniaria) (Irei et al., 2015).

The microbial species biodiversity in corals and sponges involved in symbiosis is very similar; thousands of prokaryotic operational taxonomic units (OTUs) and thousands of viral types have already been described (Li et al., 2014). Advances in techniques and methodologies have provided a great insight into taxonomic inventory surveys, thus enabling us to determine host specificity between bacterial species and coral hosts (Sunagawa et al., 2010). However, there is a lack of knowledge about how variations in temporal, spatial, and mainly, environmental conditions and different coral species could affect prokaryote–host relationship. There are several possible roles of prokaryotes in coral and sponges holobionts (host and its associated microbiota),

including immunology (Work and Aeby, 2014), host resilience (Raina et al., 2013), host health and disease resistance (Krediet et al., 2013a; Krediet et al., 2013b), nutrient uptake and cycling (Ceh et al., 2013; Lema et al., 2012; Lesser et al., 2004; Yang et al., 2013), and pathogenesis and disease. Several articles have been published focusing on coral disease syndromes after the most prominent cause of global reef decline was related to pathogens (Pratte, 2013; Richardson, 2012; Rosenberg et al., 2007b).

Several studies report a close association between microorganisms and zoanthid hosts. The role of zoanthid-associated bacteria in nitrogen cycling and their nitrogenase activity have already been described. Nitrogen-fixing bacteria belonging to Vibrionaceae were previously isolated from zoanthids (Shieh and Lin, 1992); in addition, cyanobacteria, Rhizobiales, *Rhodobium* sp., and some other bacterial groups involved in the steps of nitrogen metabolism such as ammonia oxidation (*Nitrospira* sp. and *Nitrosococcus* sp.) were recovered from zoanthids. The dinoflagellate *Symbiodinium* has also been found to be associated with Zoanthidea; this microorganism provides an energy reserve by fixing carbon for the host. Similarly, the isolation of hemolytic bacteria producing palytoxin was described; this suggests the participation of this microorganism in host chemical defense. Diverse actinobacterial genera have already been described to be associated with zoanthids. Considering that many of them are antibiotic producers, they produce bioactive compounds that protect the zoanthid host against pathogens (Sun et al., 2014). Some independent cultivation approaches strongly suggest that the two most dominant bacterial phyla associated with zoanthid

* Corresponding author at: Setor de Genética - ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-900 Maceió, AL, Brazil.

E-mail address: melissa.landell@gmail.com (M.F. Landell).

¹ Equal contributors.

Palythoa samples are Acidobacteria and Proteobacteria (O'Connor-Sánchez et al., 2014).

Long-term monitoring suggests that globally declining coral cover is mainly caused by overfishing, climate change, and disturbances due to river runoff enriched with nutrients and sediments (D'Angelo and Wiedenmann, 2014). In coastal waters, sewage discharge is an important pollution source that can cause elevated concentrations of nutrients (Reopanichkul et al., 2009). This in turn favors nutrient-limited, r-selected, and potentially pathogenic taxa, facilitating their establishment in coral ecosystems (Zaneveld et al., 2016). In addition, sewage introduces many microbial taxa that link human pathogens and the coral bacterial community (Closek et al., 2014). Climatic and anthropogenic stressors lead to shifts in the composition of the bacterial community of coral reefs, thus compromising normal functioning of coral species and predisposing them to opportunistic infection (Bally and Garrabou, 2007; Harvell et al., 1999; Harvell et al., 2002; Lesser, 2007).

Zoanthids often dominate sites where stress conditions lead to a decrease in scleractinian corals and may occupy >50% of the reef surface area. *Palythoa caribaeorum* is one such zoanthid and a key species in the functioning of coral reefs in northeastern Brazil (Francini-Filho et al., 2013), where it frequently dominates disturbed reefs because of its physiological tolerance, high reproductive rates (Silva et al., 2015), and production of mucus that protects it against desiccation (Denny, 1989). Information regarding the composition of the bacterial community can help to monitor the health of the host as it tends to change before noticeable symptoms appear in the host colonies. The present study aims to assess the effects of direct sewage discharge on the bacterial community associated with the zoanthid *P. caribaeorum* by pyrosequencing the partial 16S rRNA gene in specimens collected from two contrasting reef sites.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Samples of *P. caribaeorum* were obtained during the summer (March 2015) from two locations in the state of Alagoas, northeast Brazil: Ponta Verde coral reef (9°66'32"S 35°69'82"W), located in an urban area and constantly exposed to untreated sewage dumping from illegal connections to storm sewers, and Sereia sandstone reef (9°56'52"S 35°64'49"W), an area less exposed to effluent (Fig. 1). At each location, fragments of approximately 10 cm² from three different and apparently healthy colonies of *P. caribaeorum* were sampled, placed in sterile plastic bags, stored on ice during transport to the laboratory, and frozen at –20 °C until DNA extraction was performed. All specimens were collected in the morning during low tide from water-filled pools. Three physico-chemical parameters (pH, temperature, and salinity) were measured using a multiparameter probe (model Hanna HI 9828), and information about bathing conditions based on thermotolerant coliform counting was obtained from Instituto do Meio Ambiente, Brazil. Permission for this study was obtained from the regulatory institution Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (license no. L. 32723-1).

2.2. DNA extraction

All samples were washed with sterile seawater prior to DNA extraction to remove loosely attached bacteria from the surface of the sample. The samples were frozen in liquid nitrogen and grinded using pestle and mortar. Next, 600 µl of CTAB extraction buffer (4 g CTAB, 16.4 g NaCl, 20 ml 1 M Tris-HCl, 8 ml 0.5 M EDTA, and 200 ml distilled water) was added to the pellets followed by vortex. After incubation at 65 °C for 1 h, the tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The supernatants were then transferred to tubes on ice and extracted with an equal volume of phenol/chloroform. Genomic DNA was precipitated with 0.3 M sodium acetate (pH 5.2) and isopropanol and collected by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min. DNA was resuspended in Milli-Q ultrapure water and stored at –20 °C.

2.3. Purification and quantitation

After extraction, the genomic DNA was purified using the PowerClean® DNA Clean-Up Kit (MoBio Laboratories, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Purity and concentration of the extracted DNA were verified using the L-Quant 2 spectrophotometer (Loccus do Brasil Ltda.; wavelength: 230, 260, and 280 nm). Extracted genomic DNA was sent to Molecular Research DNA Laboratory (Shallowater, TX, USA) for pyrosequencing.

2.4. PCR amplicon library preparation for pyrosequencing

Bacterial 16S rRNA gene was amplified using primers 27F (3'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-5') and 1492R (5'-TACCTGTAGACTT-3'). After the initial 25 cycles, another 5 cycles were performed so that each sample's barcode sequences and A and B adapters were included. After the PCR, all the amplicons produced from different samples were mixed in equal concentrations and purified using Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Amplicon libraries were bound to the beads under favorable conditions with only one fragment per bead, and the beads were emulsified in a PCR mixture in oil. The amplicons were sequenced using the GS FLX titanium Roche platform (454 pyrosequencing technology) and reagents according to the manufacturer's instructions.

2.5. 16S rRNA amplicon sequence analysis

The sequences obtained were analyzed according to the UPARSE + Qiime protocol proposed by the Brazilian Microbiome Project (Pylro et al., 2014), with some modifications. Briefly, reads were assigned to respective samples according to their barcodes, and primer sequences were removed in the demultiplex step. The sequences were filtered according to quality (maximum error expected = 1.0) and trimmed to 250 bp. No ambiguous bases were included. Sequences were dereplicated and simultaneously checked for chimeras using a *de novo* approach and later checked again with UCHIME (Edgar et al., 2011) against 16S "Gold" database (reference database in the Broad Microbiome Utilities). Reads with ≥97% similarity were grouped into OTUs using the USEARCH

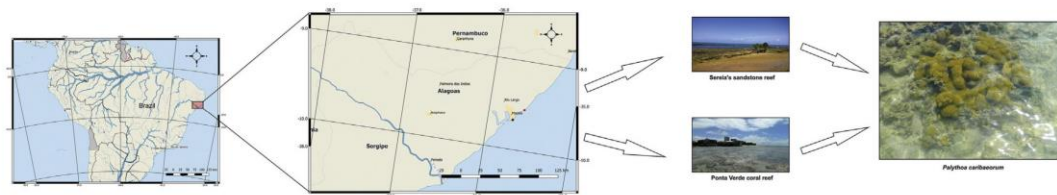


Fig. 1. Locations of the metagenomic sampling sites. Black circle indicates Ponta Verde coral reef and red circle indicates Sereia sandstone reef. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article as: Paulino, G.V.B., et al., Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral *Palythoa caribaeorum* due to anthropogenic effects, Marine Pollution Bulletin (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.039>

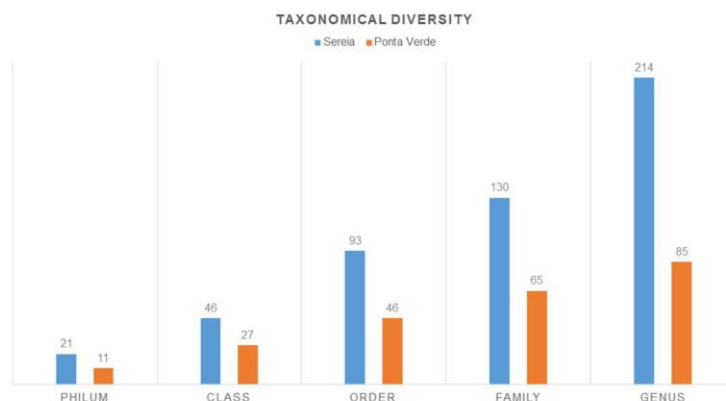


Fig. 2. The number of taxa found in the two sampled reefs sites. Sereia reef shows a greater bacterial diversity, whereas Ponta Verde reef, which is located in an urban area and exposed to illegal sewage dumping, shows a lower diversity.

algorithm. Taxonomic classification was implemented with BLAST (e-value = 10^{-5}) against 16S rRNA SILVA database (SILVA version 119, available at <http://www.arb-silva.de/>) (Pruesse et al., 2007). All singletons were excluded from further analysis.

The most abundant read for each OTU was selected as representative, then aligned using PyNast with aligned Silva sequences as reference, and screened with Lane mask to build a phylogenetic tree using FastTree (Price et al., 2009). To evaluate the community structure, equal sequencing depth per sample was established by multiple rarefactions to the smallest sequencing depth. OTU diversity was examined using the biodiversity index by Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME v.1.9) package (Caporaso et al., 2010). To compare community composition across samples, we assessed beta diversity using weighted and unweighted UniFrac (Lozupone and Knight, 2005), a phylogenetically informed metric. Principal coordinates analysis (PCoA) was used to visualize the differences between the samples.

3. Results and discussion

The pyrosequencing analysis of these samples resulted in a total of 26,166 16S rRNA sequences. After quality control, 8988 high-quality

sequences were retained, and 459 OTUs were generated at 97% identity. All raw sequence data were deposited in NCBI Sequence Read Archive and can be accessed under BioProject accession number PRJNA327692.

Taxonomic assignment of good quality reads showed that a high level of bacterial taxonomical diversity was associated with *P. caribaeorum* samples; however, the number of taxa present at the two reefs sites were very different (Fig. 2). This observation indicates a greater anthropogenic effect on Ponta Verde reef than on Sereia reef, reflecting the continuous discharge of sewage directly on to the former reef. A recent study of the coast of Jeddah, the largest city on the Saudi Arabian coast, reported that coral-associated microbial communities from two distinct scleractinian corals were different between a relatively unaffected area and the affected one (Ziegler et al., 2016). A decrease in abundance was observed in the main symbiotic taxon, followed by an increase in abundance of opportunistic families such as Vibrionaceae and Rhodobacteraceae.

In total, 15 described phyla (Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, planctomycetes, proteobacteria, spirochaetes, Tenericutes, and Verrucomicrobia) previously reported in corals and six more candidate phyla (BD1-5, NPL-

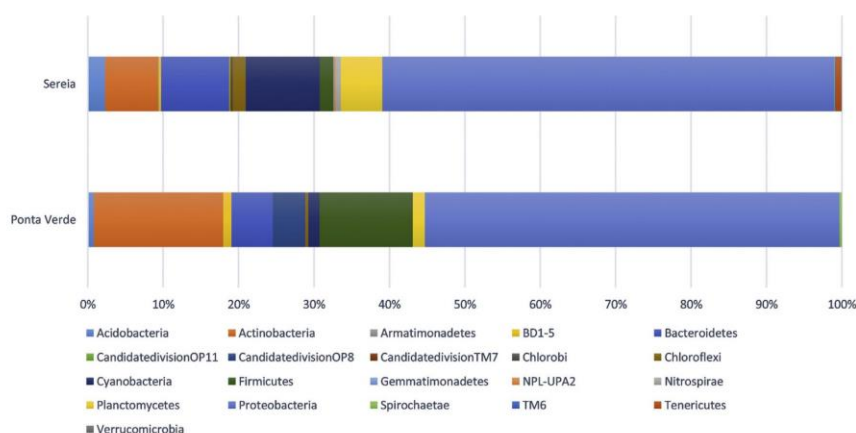


Fig. 3. Stack plot showing the mean proportion of bacterial phyla contributing to the microbial community of *Palythoa caribaeorum* collected from Sereia sandstone reef and Ponta Verde coral reef ($n = 3$ per species and site).

Please cite this article as: Paulino, G.V.B., et al., Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral *Palythoa caribaeorum* due to anthropogenic effects, Marine Pollution Bulletin (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.039>

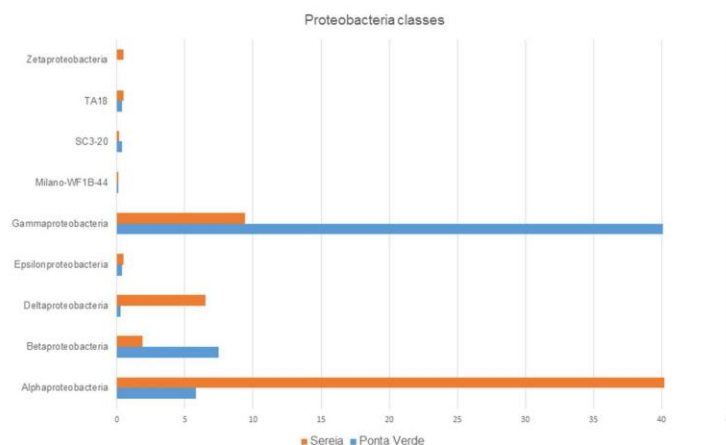


Fig. 4. Abundance of bacteria from Proteobacteria phylum in both the sampled areas.

UPA2, OP8, OP11, TM6, and TM7) were recovered (Fig. 3). Twenty phyla were obtained from Sereia reef samples, whereas only 11 were obtained from Ponta Verde reef samples. Proteobacteria were the most abundant phylum (mean = 57%) at both the points, whereas the proportion of other phyla varied between reefs. In Ponta Verde reef samples, 17% of the reads were classified as Actinobacteria, followed by Firmicutes (12.4%) and Bacteroidetes (5.5%), whereas in Sereia reef samples, the major group was cyanobacteria (9.7%), followed by Bacteroidetes (9%) and Actinobacteria (7%). Overall, at this taxonomic level, the composition of bacterial communities associated with zoanthid *P. caribaeorum* was different, mainly in the abundance of the shared groups, from that found in *P. australiae*, which was collected in southern China. However, both species shared the occurrence of Chloroflexi, which is rarely reported to be associated with corals (Sun et al., 2014).

Substantial variations were observed in the OTU classification analyses at the class level (48 in total). The samples collected at Sereia reef exhibited a high abundance of Alphaproteobacteria (40.2%), a main dominant group found in association with corals (McKew et al., 2012; Morrow et al., 2012), followed by Gammaproteobacteria (9.4%) and cyanobacteria (8.9%). According to previous phylogenetic surveys, these three groups are known as dominant symbiont residents associated with corals (Bourne et al., 2016). In contrast, Ponta Verde reef contained varying proportions of Gammaproteobacteria (40.1%), followed by Actinobacteria (17%) and Bacilli (12%) (Fig. 4). This high variability of bacterial communities in coral species across geographic

regions has been previously observed (Morrow et al., 2012; Sunagawa et al., 2010), though to a lesser degree.

The microbial community composition is presumed to reflect the metabolic roles of the microorganisms, which may play an important role in the element cycle in the ecosystem in association with their invertebrate host or produce compounds with antimicrobial activity. In this study, bacterial groups that are involved in some steps of nitrogen metabolism such as N_2 fixation (cyanobacteria, Rhizobiales, and *Rhodobium* sp.) were recovered from the zoanthid. Cyanobacteria play an essential role in modern coral reef ecosystems and are mainly present in the coral tissue and skeleton (Lampert et al., 2008), providing nitrogen and carbon to the coral reef ecosystems through nitrogen fixation (Bouvy et al., 2012). Actinobacteria is generally a ubiquitous major group in corals and contains diverse species that show antibacterial activities and possibly contribute to coral health and provide new opportunities for natural product search and discovery (Kuang et al., 2015).

Our results showed that the reef that was directly affected by domestic sewage had a more heterogeneous and less diverse microbial community among the replicates, which can be attributed to the greater dominance of groups related to human pathogens. Alpha and beta diversity analyses were performed after rarefying the samples to the smallest library (581 sequences). Good's coverage ratio ranged between 98.7% at Ponta Verde reef and 93.3% at Sereia reef. According to Shannon index value (H'), a greater diversity of OTUs was found at Sereia reef (H

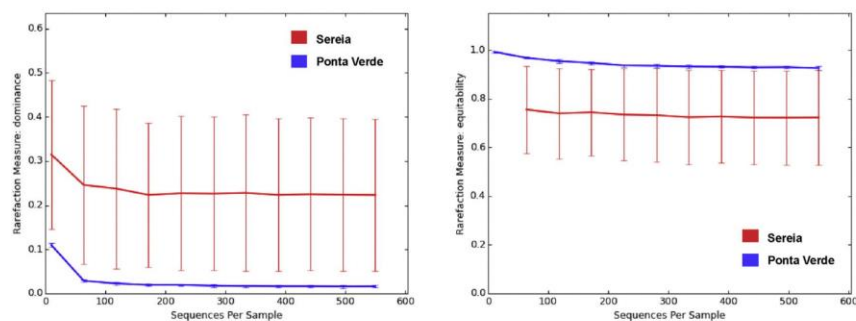


Fig. 5. Charts showing the values of dominance and equitability indices for the six collected samples (sample depth = 581).

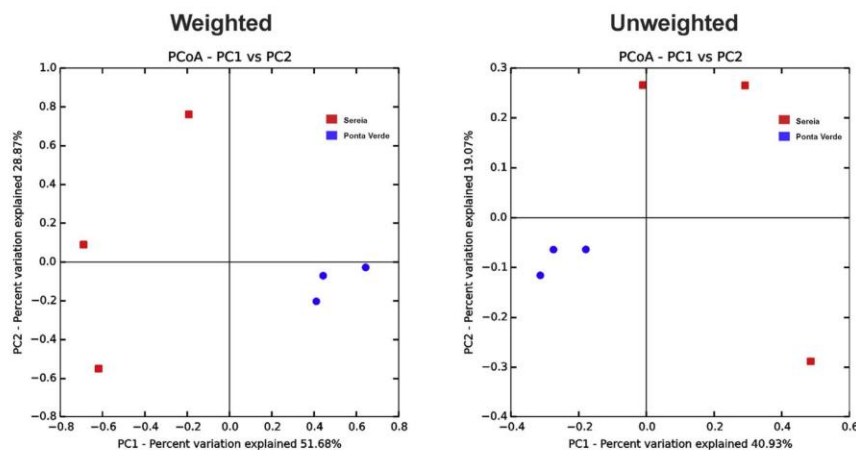


Fig. 6. Weighted and unweighted UniFrac principal coordinate analysis plots computed at exactly 581 sequences/sample illustrate the relationship between samples (blue = Sereia, red = Ponta Verde) showing similarities in bacterial communities. Percentages of variance explained by each principal coordinate (P1 and P2) are shown on the X- and Y-axes (sample depth = 581). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

' = 6.5) than at Ponta Verde reef ($H' = 3.35$). Five of six samples exhibited a Proteobacteria dominance and high equability indices among the associated bacterial assemblages (Figs. 3 and 5). Several studies have previously shown changes in the microbial community composition when comparing healthy and diseased corals. The former tends to exhibit a greater diversity, whereas microbial diversity tends to decline in diseased corals (Cárdenas et al., 2012; de Castro et al., 2010; Kellogg et al., 2013). Moreover, shifts in microbial diversity have been related to the proximity of corals to human populations (Morrow et al., 2012). Thus, there is a strong possibility that the apparently healthy samples collected from the Ponta Verde reef are in the initial phases of a disease process.

Previous studies have shown a species-specific relationship between some bacteria species and their host coral, and a similar profile of bacterial populations is expected for conspecific corals that are geographically separated (Bourne and Munn, 2005; Carlos et al., 2013; Rohwer et al., 2002; Rosenberg et al., 2007a). At Sereia reef, the samples shared 21 OTUs, with most reads (158) belonging to the *Propionibacterium* genera. In Ponta Verde reef, there were only three OTUs: two classified as *Propionibacterium* and one classified as *Staphylococcus*. The number of OTUs shared between the reefs was relatively low: two classified as *Propionibacterium* and one classified as *Staphylococcus*. Our results also differ from those obtained by Lee et al. (2012) who found that corals from disturbed areas appeared to share similar bacterial communities. The PCoA plot of the UniFrac distance matrix (Fig. 6) easily distinguishes between the bacterial communities of the two sites, showing a greater similarity between samples from Sereia than those from Ponta Verde. Coral microbiomes are assumed to be host species specific. However, this specificity depends on the health state of the coral (Sunagawa et al., 2010).

Among the analyzed environmental parameters, the measures of thermotolerant coliforms in the water showed significantly different values between the reefs (Table 1). The other environmental variables, namely temperature and salinity, showed no significant difference between the two areas. Ponta Verde reef had higher thermotolerant coliform levels, which supports the presence of greater anthropogenic effect at this reef. Together with streptococci, thermotolerant coliforms are standard microbiological indicators of water quality (Stabili et al., 2013). However, this indicator has some limitations. Specifically, temporal fluctuations in environmental conditions combined with rapid biodegradation in tropical marine environments render it difficult to

precisely evaluate and quantify the effect of water quality change on marine ecosystem health (Kriwy and Uthicke, 2011) and, by extension, how it influences coral-associated microbiota. Nevertheless, fecal coliforms are a strong indicator of the presence of domestic sewage and an indication that there may be other unrecognized microbial groups, some of which may be pathogenic (Neill, 2004).

The bacterial community of Ponta Verde reef had less OTUs than that of Sereia reef (Fig. 7). Moreover, the bacterial community associated with *P. caribaeorum* at Ponta Verde contained a high proportion of groups causing human diseases among the most abundant genera: *Propionibacterium* (8.9%), *Corynebacterium* (4.9%), *Streptococcus* (3.9%), *Staphylococcus* (2.4%), *Bacilli* (2.1%) and *Pseudomonas* (1.5%). An increase in bacteria and fungi causing animal diseases has been previously noticed in corals at aquariums subjected to reduced pH, elevated temperatures, and higher levels of nutrients (Thurber et al., 2009). There is also evidence of a relationship between proximity to sewage effluent and the prevalence of coral diseases such as BBD and white plague type II (Post, 2005).

A better understanding of bacterial communities associated with zoanthids would help in understanding their prevalence in the Brazilian coast and physiological characteristics that favor their dominance in disturbed environments, which are usually not supported by scleractinian corals; this in turn will enable us to monitor biotic and abiotic events that affect marine community structures, such as pathogen outbreaks. The least number of taxa and highest indices of dominance found in Ponta Verde reef indicate a disruption of bacterial community that may be associated with the sewage dumping that occurs in the region. Our results suggest that microbial community analyses of apparently healthy corals will provide an early indicator of disease before the coral host exhibits any pathological symptoms and serve as a complementary bioindicator for thermotolerant coliforms; however, this can only be confirmed by monitoring colony microbiota before and during the manifestation of the disease.

Table 1
Mean of the environmental parameters measured in each sample from the two reefs.

Reefs	pH	Salinity (%)	Temperature (°C)	Thermotolerant coliforms (MPN)
Ponta Verde	8.04	37.22	29.54	2400
Sereia	8.71	37.07	30.75	<18

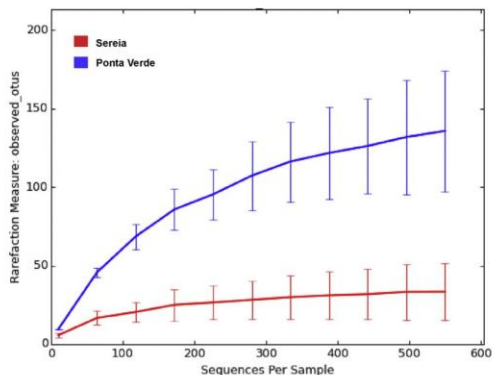


Fig. 7. Graphic representation of the average number of OTUs observed among the samples of each studied reefs, showing the greatest diversity in Sereia reef (sample depth = 581).

Author contributions

GVBP, LB, and MFL conceived the study; GVBP and MFL collected samples; GVBP conducted lab work; GVBP, LB, and VSP analyzed data; and GVBP, LB, VSP, and MFL wrote the manuscript. MFL provided research materials and logistics. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process numbers 408718/2013-7 and 475378/2013-0). The authors also thank Professor Monica Dorigo Correia for assistance during sample collection, Dr. Scot Dowd from MR DNA laboratory for performing the pyrosequencing, and Dr. Richard Ladle and Dr. Ana Malhado for editing the manuscript for language. GVBP received a fellowship from CAPES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.039>. These data include the Google map of the important areas described in this article.

References

- Bally, M., Garrabou, J., 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Glob. Chang. Biol.* 13, 2078–2088.
- Bourne, D.G., Munn, C.B., 2005. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environ. Microbiol.* 7, 1162–1174.
- Bourne, D.G., Morrow, K.M., Webster, N.S., 2016. Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 317–340.
- Bouvy, M., Combe, M., Bettarel, Y., Dupuy, C., Rochelle-Newall, E., Charpy, L., 2012. Uncoupled viral and bacterial distributions in coral reef waters of Tuamotu archipelago (French Polynesia). *Mar. Pollut. Bull.* 65, 506–515.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.L., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Tumbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Cárdenas, A., Rodríguez-R, L.M., Pizarro, V., Cadavid, L.F., Arévalo-Ferro, C., 2012. Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *ISME J.* 6, 502–512.
- Carlos, C., Torres, T.T., Ottoboni, L.M., 2013. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci. Report.* 3, 1624.

- Ceh, J., Kilburn, M.R., Cliff, J.B., Raina, J.-B., van Keulen, M., Bourne, D.G., 2013. Nutrient cycling in early coral life stages: *Pocillopora damicornis* larvae provide their algal symbiont (*Symbiodinium*) with nitrogen acquired from bacterial associates. *Ecol. Evol.* 3, 2393–2400.
- Closek, C.J., Sunagawa, S., DeSalvo, M.K., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Weber, M.X., Voolstra, C.R., Andersen, G.L., Medina, M., 2014. Coral transcriptome and bacterial community profiles reveal distinct yellow band disease states in *Orbicella faveolata*. *ISME J.* 8, 2411–2422.
- D'Angelo, C., Wiedenmann, J., 2014. Impacts of nutrient enrichment on coral reefs: new perspectives and implications for coastal management and reef survival. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 7, 82–93.
- de Castro, A.P., Araújo, S.D., Reis, A.M., Moura, R.L., Francini-Filho, R.B., Pappas, G., Rodrigues, T.B., Thompson, F.L., Krüger, R.H., 2010. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microb. Ecol.* 59, 658–667.
- Denny, M.W., 1989. Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 43, 337–366.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200.
- Francini-Filho, R.B., Coni, E.O., Meirelles, P.M., Amado-Filho, G.M., Thompson, F.L., Pereira-Filho, G.H., Bastos, A.C., Abrantes, D.P., Ferreira, C.M., Gibrán, F.Z., Güth, A.Z., Sumida, P.Y., Oliveira, N.L., Kaufman, L., Mente-Verá, C.V., Moura, R.L., 2013. Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. *PLoS One* 8, e54260.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505–1510.
- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2162.
- Irei, Y., Sinniger, F., Reimer, J.D., 2015. Descriptions of two azooxanthellate *Palythoa* species (subclass Hexacorallia, order Zoantharia) from the Ryukyu archipelago, southern Japan. *Zookeys* 1–26.
- Kellogg, C.A., Piceno, Y.M., Tom, L.M., DeSantis, T.Z., Gray, M.A., Zawada, D.G., Andersen, G.L., 2013. Comparing bacterial community composition between healthy and white plague-like disease states in *Orbicella annularis* using PhyloChip™ G3 microarrays. *PLoS One* 8, e79801.
- Krediet, C.J., Ritchie, K.B., Alagely, A., Teplitski, M., 2013a. Members of native coral microbiota inhibit glycosidases and thwart colonization of coral mucus by an opportunistic pathogen. *ISME J.* 7, 980–990.
- Krediet, C.J., Ritchie, K.B., Paul, V.J., Teplitski, M., 2013b. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings of the Royal Society B—Biological Sciences* 280.
- Kriwiy, P., Uthicke, S., 2011. Microbial diversity in marine biofilms along a water quality gradient on the Great Barrier Reef. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 116–126.
- Kuang, W., Li, J., Zhang, S., Long, L., 2015. Diversity and distribution of actinobacteria associated with reef coral *Porites lutea*. *Front. Microbiol.* 6, 1094.
- Lampert, Y., Kelman, D., Nitzan, Y., Dubinsky, Z., Behar, A., Hill, R.T., 2008. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 187–198.
- Lee, L.H., Cheah, Y.K., Mohd Sidik, S., Ab Mutalib, N.S., Tang, Y.L., Lin, H.P., Hong, K., 2012. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2125–2137.
- Lema, K.A., Willis, B.L., Bourne, D.G., 2012. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3136–3144.
- Lesser, M.P., 2007. Coral reef bleaching and global climate change: can corals survive the next century? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5259–5260.
- Lesser, M.P., Mazel, C.H., Gorbunov, M.Y., Falkowski, P.G., 2004. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science* 305, 997–1000.
- Li, Z.-Y., Wang, Y.-Z., He, L.-M., Zheng, H.-J., 2014. Metabolic profiles of prokaryotic and eukaryotic communities in deep-sea sponge *Lamellomorpha* sp indicated by metagenomics. *Sci. Report.* 4.
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235.
- McKew, B.A., Dumbrell, A.J., Daud, S.D., Hepburn, L., Thorpe, E., Mogensen, L., Whitby, C., 2012. Characterization of geographically distinct bacterial communities associated with coral mucus produced by *Acropora* spp. and *Porites* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5229–5237.
- Morrow, K.M., Moss, A.G., Chadwick, N.E., Liles, M.R., 2012. Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6438–6449.
- Neill, M., 2004. Microbiological indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 752–760.
- O'Connor-Sánchez, A., Rivera-Domínguez, A.J., Santos-Briones, C.E.L., López-Aguilar, L.K., Peña-Ramírez, Y.J., Prieto-Davo, A., 2014. Acidobacteria appear to dominate the microbiome of two sympatric Caribbean sponges and one zoanthid. *Biol. Res.* 47, 67.
- Post, C.W., 2005. Is there a relationship between proximity to sewage effluent and the prevalence of coral disease? *Caribb. J. Sci.* 41, 124–137.
- Pratte, Z.A., 2013. Microbial functional genes associated with coral health and disease. *Dis. Aquat. Org.* 107, 161–171.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188–7196.

- Pyro, V.S., Roesch, L.F.W., Morais, D.K., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Totola, M.R., 2014. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J. Microbiol. Methods* 107, 30–37.
- Raina, J.-B., Tapiolas, D.M., Foret, S., Lutz, A., Abrego, D., Ceh, J., Seneca, F.O., Clode, P.L., Bourne, D.G., Willis, B.L., Motti, C.A., 2013. DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. *Nature* 502, 677–680.
- Reopanichkul, P., Schlacher, T.A., Carter, R.W., Worachananant, S., 2009. Sewage impacts coral reefs at multiple levels of ecological organization. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1356–1362.
- Richardson, L.L., 2012. Arnfried Antonius, coral diseases, and the AMLC. *Revista De Biologia Tropical* 60, 13–20.
- Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F., Knowlton, N., 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 1–10.
- Rosenberg, E., Kellogg, C.A., Rohwer, F., 2007a. Coral microbiology. *Oceanography* 20, 146–154.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I., 2007b. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 355–362.
- Shieh, W.Y., Lin, Y.M., 1992. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with the zoanthid *Palythoa tuberculosa* Esper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 31–41.
- Silva, J.F., Gomes, P.B., Santana, E.C., Silva, J.M., Lima, É., Santos, A.M., Pérez, C.D., 2015. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 985–996.
- Stabili, L., Terlizzi, A., Cavallo, R.A., 2013. Sewage-exposed marine invertebrates: survival rates and microbiological accumulation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 1606–1616.
- Sun, W., Zhang, F., He, L., Li, Z., 2014. Pyrosequencing reveals diverse microbial community associated with the zoanthid *Palythoa australiae* from the South China Sea. *Microb. Ecol.* 67, 942–950.
- Sunagawa, S., Woodley, C.M., Medina, M., 2010. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS One* 5.
- Thurber, R.V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R.A., Angly, F., Dinsdale, E., Kelly, L., Rohwer, F., 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ. Microbiol.* 11, 2148–2163.
- Work, T.M., Aeby, G.S., 2014. Microbial aggregates within tissues infect a diversity of corals throughout the Indo-Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 500, 1–9.
- Yang, S., Sun, W., Zhang, F., Li, Z., 2013. Phylogenetically diverse denitrifying and ammonia-oxidizing bacteria in corals *Alcyonium gracillimum* and *Tubastraea coccinea*. *Mar. Biotechnol.* 15, 540–551.
- Zaneveld, J.R., Burkepile, D.E., Shantz, A.A., Pritchard, C.E., McMinds, R., Payet, J.P., Welsh, R., Correa, A.M., Lemoine, N.P., Rosales, S., Fuchs, C., Maynard, J.A., Thurber, R.V., 2016. Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. *Nat. Commun.* 7, 11833.
- Ziegler, M., Roik, A., Porter, A., Zubier, K., Mudarris, M.S., Ormond, R., Voolstra, C.R., 2016. Coral microbial community dynamics in response to anthropogenic impacts near a major city in the central Red Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 105, 629–640.

ARTIGO 2: Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs

Arch Microbiol
DOI 10.1007/s00203-016-1254-0



ORIGINAL PAPER

Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs

Danielle M. Pagani^{1,2} · Daiane Heidrich^{3,4} · Gustavo V. B. Paulino^{1,2} ·
Karine de Oliveira Alves³ · Paula T. Dalbem³ · Caroline F. de Oliveira³ ·
Zilvia M. M. Andrade³ · Carolini Silva³ · Monica D. Correia⁵ ·
Mariana Lucia Scrofernecker^{3,4} · Patricia Valente³ · Melissa Fontes Landell¹

Received: 8 March 2016 / Revised: 2 May 2016 / Accepted: 2 June 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract *Candida* is a common fungus with the capacity to cause infections in humans. However, most studies have concentrated on clinical isolates and little is known about the identity, ecology and drug resistance of free living species/strains. Here, we isolate eight strains of *Candida haemulonii* and four strains of *Cutaneotrichosporon dermatis* from three marine cnidarian zoanthids species (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus sociatus*) collected from Brazilian coral reefs. Strains were identified by sequencing of the D1/D2 domain LSU rDNA and ITS region. We tested these environmental isolates for their capacity to grow in media with increasing concentration of NaCl, capacity to grow in different temperatures, enzymatic activity and antifungal susceptibility. For *C.*

haemulonii, all strains strongly produced gelatinase, esterase and albuminase and were either able to express lipase, phospholipase and keratinase, but not express urease and DNase. The strains were able to grow at 37 °C, but not at 39 °C, and except for LMS 40, all of them could grow in a 10 % NaCl medium. All isolates were resistant to all antifungals tested, with exception for ketoconazole and tioconazole (MIC = 2 µg/mL). For *C. dermatis*, all strains could grow at 39 °C and could not express phospholipase, keratinase or gelatinase. However, all were capable of expressing urease, lipase and esterase. Three out of four strains could grow in a 10 % NaCl medium, but none grew in a 30 % NaCl medium. The strains showed high values of minimal inhibitory concentration. LMPV 90 was resistant to tioconazole, terbinafine, fluconazole and posaconazole, and LMS 38 was resistant to all antifungal agents tested. We discuss the characterization of *C. haemulonii* and *C. dermatis* as a possible emerging pathogen due to its animal-related enzymatic arsenal and antifungal resistance.

Communicated by Erko Stackebrandt.

✉ Melissa Fontes Landell
melissa.landell@gmail.com

¹ Setor de Genética, ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL CEP 57072-900, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação dos Recursos, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Maceió, AL CEP 57072-900, Brazil

³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS CEP 90050-170, Brazil

⁴ Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

⁵ Setor de Comunidades Bentônicas, ICBS/LABMAR, Universidade Federal de Alagoas, Rua Aristeu de Andrade, 452 – 2º andar, Farol, Maceió, AL CEP 57051.090, Brazil

Keywords *Candida haemulonii* · *Cutaneotrichosporon dermatis* · Invertebrates · Antifungal susceptibility · Enzyme production · Emerging pathogens

Introduction

Candida is an ascomycetous yeast genus which contains species that are recognized as some of the most pathogenic opportunistic yeasts (Diezmann et al. 2004). *C. haemulonii*, originally *Torulopsis haemulonii*, was first described in 1962 from a marine fish gut (van Uden and Kolipinski 1962; Cendejas-Bueno et al. 2012). Recently, Ferreira et al. (Ferreira et al. 2010) isolated *C. haemulonii* from cassava and, based on molecular markers, placed the species into a

Published online: 09 June 2016



complex: *C. haemulonii* group I and *C. haemulonii* group II. However, Cendejas-Bueno et al. (2012) classified group II as a new species: *Candida duobushaemulonii* and a new variety in *C. haemulonii* I: *C. haemulonii* var. *vulnera*.

C. haemulonii was first reported infecting a patient in 1984, while in Brazil, the first record was in 2012 in a blood stream of a 26-year-old immunosuppressed woman (de Almeida et al. 2012). This yeast has also been implicated in osteitis in a 37-year-old man in addition to blood stream infection and neonate and senior fungemia (Al-Sweih et al. 2009; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; Kim et al. 2011). In the Al-Sweih et al. (2009), *C. haemulonii* was the third most isolated yeast from *Candida* genus from the blood culture of neonates.

Indeed, candidiasis has been identified as prevalent fungal infection causing deaths in hospitals worldwide. Although most reported cases of candidiasis are caused by *Candida albicans*, the number of infections caused by other *Candida* species has been increasing (Johnson 2009; Oberoi et al. 2012; Deorukhkar et al. 2014). Thus, although *C. haemulonii* rarely causes infections, it is classified as an emerging pathogen due to its wide distribution and resistance to the antifungal amphotericin B (Johnson 2009; Kim et al. 2011; Merseguet et al. 2015).

Trichosporon is a basidiomycetous yeast-like genus that has been implicated in opportunistic infections. It is widespread in the environment, being found in both tropical and temperate areas (Colombo et al. 2011). In humans, it can be found in the gastrointestinal tract and transiently colonizing respiratory tracts and skin (Hashino et al. 2013; Iturrieta-Gonz lez et al. 2014). *Trichosporon* spp. and *Cutaneotrichosporon comb. nov.* can be commonly isolated from environmental samples such as water, soil and decomposing matter (Colombo et al. 2011; Iturrieta-Gonz lez et al. 2014). However, *Cutaneotrichosporon dermatis* (formerly *Trichosporon dermatis*) first isolated from hydrothermal fields (Gadanhó and Sampaio 2005) and then from deep-sea sediments of the Pacific Ocean in 2014 (Xu et al. 2014). This species was transferred from the *Cryptococcus humicola* complex to the *Trichosporon* genus as described by Sugita et al. (2001) and to *Cutaneotrichosporon* by Liu et al. (2015). The species has subsequently been reported as an infectious yeast in skin, blood and nails. It has also been reported as summer-type hypersensitivity pneumonitis.

Invasive *Trichosporon* and *Cutaneotrichosporon* infections have been increasingly identified during the past 30 years. Most cases occur in patients with hematological diseases, particularly those with acute leukemia (Miceli et al. 2011). It is the second most common cause of fungal infections in these patients, and mortality rate of patients with hematological diseases and *Trichosporon* and *Cutaneotrichosporon* is 11 %, despite antifungal therapy (Polvi et al. 2015). Several case reports around the world

described its pathogenicity (Fan et al. 2011; Iturrieta-Gonz lez et al. 2014; Taverna et al. 2014). For example, a patient developed fatal disseminated *C. dermatis* infection after cord blood transplant with aplasia (Fekkar et al. 2009). Another case describes a 47-year-old woman with Burkitt's leukemia who was diagnosed with fungemia caused by *C. dermatis*. In this case, the administration of voriconazole at standard dose was ineffective (Hashino et al. 2013).

In this research, we report the isolation of eight strains of *C. haemulonii* and four strains of *C. dermatis* from marine soft coral in northeastern Brazil, and discuss their characterization as possible emerging pathogens. Because of the potentially pathogenic nature of this species, we also test potential enzymatic virulence factors and susceptibility to several antifungal agents.

Materials and methods

Yeasts isolation

The strains were isolated from three marine zoanthids species (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus sociatus*). Samples were collected at Ponta Verde coral reef (9°39'59.15"S, 35°41'46.11"W) and at Sereia's sandstone reef (9°33'54"S, 35°38'39"W), both adjacent to Macie City, Alagoas State, northeastern Brazil.

The marine soft corals samples were washed with sterile seawater to remove the debris, cut in small pieces and pounded with a mortar and pestle. We inoculated decimal dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) in Wickerham's YM medium with seawater, supplemented with 0.04 % chloramphenicol and incubated samples at 22 °C for up to 28 days. Representatives of each colonial morphotype were purified twice in YEPD medium (2 % dextrose, 1 % peptone, 0.5 % yeast extract and 2 % agar). For conservation, the isolates were kept in vials with YEPD media covered with sterile mineral oil at 4 °C.

Molecular identification

Strains were cultured aerobically in Sabouraud broth at 22 °C. Samples were centrifuged at 8000×g for 5 min to recover cells. The pellet was then washed with sterile distilled water and centrifuged again (as above). Samples were diluted with 500 µL of buffer lysis (0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2 % SDS pH 8,0) and incubated at 65 °C for 1 h, after which 200 µL potassium acetate (5 M, pH 4,8) was immediately added to the tubes and then placed in an ice bath for 30 min. The samples were then centrifuged at 14,100×g for 5 min after which the supernatant was transferred to another tube and centrifuged again. The supernatant was transferred to another tube,

600 μL of absolute isopropanol was added and the sample was incubated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. After a centrifugation at $14,100\times g$ for 20 min, the DNA was collected by centrifugation at $13,000\times g$ for 15 min and washed with 70 % ethanol. The supernatant was discarded and, after drying, the DNA was resuspended in TE buffer (Tris–EDTA pH 7.4) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. To amplify divergent D1/D2 domain of LSU rRNA gene and ITS region, universal primers NL1, NL4 and ITS1, ITS4 were used (Kurtzman and Robnett 1998). Amplification conditions were: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 35 cycles at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s, and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 90 s, and a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 min. Sequencing was performed as described by Pter et al. (2009) in the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Obtained sequences were compared using the BLAST tool with those deposited at the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al. 1990).

Growth at 37 and 39 $^{\circ}\text{C}$

Tests of growth at 37 and 39 $^{\circ}\text{C}$ for 5 days were performed in test tubes containing YEPD broth in triplicate. Wickerham's card was used to monitor turbidity.

Enzymatic activity assays

Standard suspensions with $1\text{--}5 \times 10^6$ cells/mL of each isolate were obtained by cultivation in Sabouraud dextrose agar for 48 h at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 10 μL of suspensions was inoculated on the specific culture media for each enzyme to be assayed (amylase, cellulase, esterase, lipase, pectinase, albuminase, caseinase, gelatinase, phospholipase, urease and DNase). Results were obtained after incubation at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days, and the precipitation zone (Pz) was calculated, unless specified otherwise. Pz was expressed as the ratio between the average diameter of the colony and the average diameter of the colony plus the degradation halo (Hankin and Anagnostakis 1975; Buzzini and Martini 2002). Amylase, cellulase and pectinase activities were quantified according to Buzzini and Martini (2002), and the isolates were inoculated in a medium specific to each enzyme. Amylase plates were revealed with a solution of iodine, with clear halos indicating a positive result. An aliquot of 0.1 % red Congo solution was added to the plates and washed with 1 M NaCl to assess cellulase production. The presence of pectinase was confirmed by the production of a clear halo around the colony when the plates were flooded with 1 % hexadecyltrimethylammonium bromide.

Esterase activity was confirmed following protocol established by (Slifkin 2000). Positive lipase activity was confirmed by the presence of a degradation halo around the

enzyme producing colonies (Atlas and Parks 1993). DNase activity was assayed according to Lopez-Martinez et al. (1994). When a degradation halo was visualized around the colonies after the addition of 37 % HCl, the assay was considered positive. *Sporothrix schenckii* ATCC 201679 was utilized as positive control.

Phospholipase activity was assayed according to Price et al. (1982): A medium of 5.73 % sodium chloride, 0.05 % calcium chloride, 1 % peptone, 2 % glucose and 2 % agar was autoclaved and cooled to approximately $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ before the addition of sterile egg yolk at a final concentration of 4 %. *C. albicans* strain ATCC 10231 was used as positive control. Urease activity was assessed using cultures inoculated in tubes containing yeast carbon base (YCB) urea agar and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h. The tubes were examined every day during 3 days for a change of color to white (Hagler and Mendon a-Hagler 1991). *Cryptococcus neoformans* ATCC 24066 was used as positive control, and *Candida albicans* ATCC 18804 was used as negative control.

Protease activity was assessed using four substrates. Albuminase assessment followed the protocol of R chel et al. (1982): The medium consisted of 0.2 % bovine serum albumin fraction V, 1.17 % YCB, and 2.5 mL of Protovit in distilled water. We inoculated the isolates on the plates and incubated them at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days. The plates were then stained with 1.0 % black starch in 20 % acetic acid solution, and excess stain was washed away using a 5 % acetic acid solution. *Candida albicans* ATCC 10231 was used as positive control. The medium for the casein degradation assay consisted of 0.5 % casein, 0.5 % glucose, 0.67 % YNB and 2 % agar, pH 7.0, following Montville (1983). The presence of degradation halos around the producing colonies was revealed by addition of 1 N HCl. Gelatinase activity assessment followed the methodology of Smith and Goodner (1958): The medium consisted of 1.2 % gelatin, 0.4 % peptone, 0.1 % yeast extract and 1.5 % agar. The cultures were washed with a saturated solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for the visualization of the degradation halos. *Nocardia caviae* was used as positive control. Keratinase activity assessment followed the methodology of Scott and Untereiner (2004). Enzymatic quantification was performed according to Giudice et al. (2012): A suspension containing $1\text{--}5 \times 10^6$ CFU/mL was inoculated into liquid basal medium with 4 mg/mL of keratin azure and incubated under agitation at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 14 days in triplicate. The cultures were centrifuged, the supernatant measured in a spectrophotometer at $\lambda = 595\text{ nm}$, and the variation in absorbance of 0.01 compared to the blank (non-inoculated tube) was considered 1 U of keratinase. A clinical isolate of *Microsporium canis* was used as a positive control.

Table 1 Origin, source and GenBank access number of the yeasts from marine zoanthids

Species	Strain	Origin	Source	GenBank access number (D1/D2 ^a , ITS ^b)
<i>C. haemulonii</i>	LMS 03	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720385 ^a
	LMS 04	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720386 ^a
	LMS 40	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720387 ^a
	LMS 54	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720388 ^a
	LMS 55	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720389 ^a
	LMS 66	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720390 ^a
	LMS 60	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720391 ^a
	LMS 67	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720392 ^a
<i>C. dermatis</i>	LMS 02	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KT981961 ^a ; KT981962 ^b
	LMS 38	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa caribaeorum</i>	KT981963 ^a ; KT981964 ^b
	LMPV 90	Ponta Verde coral reef	<i>Zoanthus sociatus</i>	KT981957 ^a ; KT981958 ^b
	LMPV 109	Ponta Verde coral reef	<i>Palythoa caribaeorum</i>	KT981959 ^a ; KT981960 ^b

Salinity tolerance experiments

A YEPD agar medium containing 10 and 30 % NaCl was used, and yeasts cell suspensions were spread on the surface. The plates were incubated for 3 weeks at 25 °C (Formoso et al. 2015).

In vitro antifungal activity

The microdilution technique was used to determine minimal inhibitory concentrations (MICs), according to the M27-A3 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008). The isolates were cultured on Sabouraud dextrose agar at 35 °C for 48 h. The inoculum was prepared by suspension of colonies in saline solution (0.85 %), and the number of cells was measured with a hemocytometer having been diluted to obtain 5×10^2 to 2.5×10^3 CFU/mL in each well. Fluconazole was tested in the range 0.125–64 µg/mL, while itraconazole, ketoconazole, voriconazole, posaconazole, tioconazole, terbinafine and amphotericin B were used in the final concentration range of 0.03–16 µg/mL. The samples were incubated at 35 °C for 48 h, and the MICs were determined as the minimal antifungal concentration that no visible growth (100 % of inhibition) was observed when compared with the control (wells without antifungal agents). After reading the MICs, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. We transferred a 50 µL aliquot from wells with no observable growth to wells with 800 µL of Sabouraud dextrose broth and incubated for 7 days at 30 °C. MFC was defined as the minimum concentration in which no fungal growth occurred (Stopiglia et al. 2011). These assays were performed in triplicate, and the quality control was performed with *Candida krusei* ATCC 6258.

Results

We isolated three strains of *C. haemulonii* from *P. variabilis* in September 2014, one in March 2015, three in May 2015 and one strain from *Z. sociatus* in May 2015: All the isolates were from the Sereia's sandstone reef (Table 1). We also isolated two strains of *C. dermatis* from *P. caribaeorum* in May 2014 and *Z. sociatus* in September 2014, all from Ponta Verde coral reef. The other two strains came from *P. caribaeorum* in March 2015 and *P. variabilis* in September 2014, also collected on the Sereia's sandstone reef. All sequences were deposited in the GenBank database (Table 1).

All strains of *C. haemulonii* were strong producers of esterase, gelatinase and albuminase and were able to express lipase, phospholipase and keratinase, but not urease and DNase (Table 2). Only LMS 40 does not grow in a 10 % NaCl medium, and all strains grew at 37 °C. All isolates were resistant to all antifungals tested, with exception of ketoconazole and tioconazole (MIC = 2 µg/mL) (Table 3).

All strains of *C. dermatis* could express urease, esterase and lipase and grew at 39 °C (Table 2), but did not express amylase, gelatinase, keratinase, pectinase or phospholipase. Only strain LMS 02 could produce caseinase. The strains LMS 38, LMPV 90 and LMPV 109 grew in the 10 % NaCl medium, but not in the 30 % NaCl medium. Strains LMS 38 and LMPV 109 produced DNase. LMS 02 and LMPV 109 had moderate production of albuminase. The geometric median MICs of all strains tested were, in ascending order: ketoconazole, voriconazole, itraconazole, tioconazole, amphotericin B, terbinafine, posaconazole and fluconazole (Table 3). The strains LMPV 90 and LMS 38 were less susceptible to almost all antifungals agents

Table 2 Enzymatic activity for yeasts strains from marine zoanthids

Enzyme tested	Precipitation zone (PZ) ^a or result											
	<i>Candida haemulonii</i> strains								<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i> strains			
	LMS 03	LMS 04	LMS 40	LMS 54	LMS 55	LMS 60	LMPV 66	LMPV 67	LMS 02	LMS 38	LMPV 90	LMPV 109
Lipase	0.60	0.70	0.77	0.68	0.74	0.61	0.64	0.68	0.245	0.36	0.35	0.32
Esterase	0.30	0.31	0.33	0.31	0.31	0.32	0.93	0.28	0.32	0.35	0.37	0.285
Pectinase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Amylase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Cellulase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	0.375	0.375	0.345
Urease	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive
Phospholipase	0.99	0.99	0.96	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	1	1	1	1
DNase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	3	3	3	3
Protease	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.8	1	0.79
Caseinase	0.34	Negative	0.38	0.38	Negative	0.38	0.37	0.39	0.22	Negative	Negative	Negative
Gelatinase	0.33	0.35	0.43	0.44	0.40	0.41	0.57	0.41	1	1	1	1
Albuminase	0.51	0.59	0.41	0.49	0.56	0.44	0.63	0.48	0.34	1	1	0.57
Keratinase	0.120	0.172	0.252	0.019	0.101	0.163	0.115	0.084	Negative	Negative	Negative	Negative

^a PZ = 1 (negative)/PZ < 1 (positive)/PZ < 0.5 (strongly positive)

with the exception of itraconazole and amphotericin B, for which all strains presented similar MICs. Comparing MICs of LMPV 90 with LMS 38, LMS 38 was less susceptible to ketoconazole and voriconazole. The MFCs of all antifungal agents were very high (Table 3). The lowest MFC was amphotericin B with a geometric median equal to 4.0 (range 2.0–8.0).

Discussion

Research about pathogenic microorganisms is often driven by the perceived need for diagnosis and treatment of infectious pathogens in a specific region. Therefore, pathogens are emerging without supervision in poor locations or developing countries (D vila et al. 2004; Miceli et al. 2011). Systemic fungal infections are generally limited to immunocompromised individuals, and detecting emerging fungi species is a slow process (Angelakis and Raoult 2014; Polvi et al. 2015). Colonization by fungi involves adherence, colonization and penetration, during which the production of hydrolytic enzymes is of great importance. Indeed, hydrolytic enzymes play a central role in infectious processes and the production of proteases and phospholipases are important virulence factors (Ramos et al. 2015). To our knowledge, there are no studies that

use environmental isolates of *C. haemulonii* and *C. dermatis*. Furthermore, sensitivity to antifungal drugs within the different species of the genus *Cutaneotrichosporon* has received little interest from the research community (Chagas-Neto et al. 2009). This strongly contrasts with *Candida*, which is of widely acknowledged medical importance and for which research has been increasing (Hobson 2003).

The isolates identified in this study display strong Pz values in enzymatic virulence factors, especially for lipase and esterase production. Half of the *C. dermatis* and all of the *C. haemulonii* strains were capable to express albuminase. These enzymes are animal-related substrates commonly regarded as potential virulence factors for human infections (Ebert and Bull 2003). In addition to the work done by (Ramos et al. 2015) on clinical isolates, all of our *C. haemulonii* isolates are strong producers of proteases and are weakly positive for the production of phospholipase.

The relationship between transmission and adaptation of fungal pathogens is a result of environmental, ecological, behavioral and evolutionary factors. High virulence (a strong enzymatic arsenal) is frequently indicative of a new host association in which the pathogen has not adapted to the new host (Chagas-Neto et al. 2008). Yeasts have the capacity to change their metabolic pathways when environmental conditions are not propitious (Hoskisson and

Table 3 Antifungal susceptibility of *C. haemulonii* and *C. dermatis* strains from marine zoanthids

Antifungal	Ketoconazole MIC/MFC (µg/mL)	Tioconazole	Posaconazole	Amphotericin B	Itraconazole	Voriconazole	Terbinafine	Fluconazole	
<i>C. haemulonii</i>	LMS 03	0.5/>16	2/16	4/>16	8/8	>16/>16	>16/>16	64/>64	
	LMS 04	0.5/>16	1/>16	2/>16	4/8	8/>16	>16/>16	64/>64	
	LMS 40	1/>16	2/>16	>16/>16	16/16	>16/>16	>16/>16	>64/>64	
	LMS 54	4/>16	2/16	>16/>16	>16/>16	>16/>16	>16/>16	>64/>64	
	LMS 60	4/>16	2/>16	>16/>16	16/16	>16/>16	>16/>16	>64/>64	
	LMS 66	1/16	2/16	4/>16	8/8	>16/>16	>16/>16	64/>64	
	LMS 67	1/>16	2/16	>16/>16	>16/>16	>16/>16	>16/>16	>64/>64	
	LMS 55	4/>16	4/16	>16/>16	8/8	>16/>16	>16/>16	>64/>64	
		2.0 (0.5–4)/>16 (16 to >16)	2.0 (1–4)/>16 (16 to >16)	>8.7 (2 to >16.0)/>16	>10.4 (4 to >16)/>11.3 (8 to >16)	>16 (8 to >16)/>16	>16/>16	>16 (>16)/>16	>64 (64 to >64)/>64
		0.125/8.0	0.125/16.0	0.25/4	2.0/8.0	0.5/>16.0	0.062/8.0	0.5/>16.0	2.0/>64.0
<i>C. dermatis</i>	LMPV 109	1.0/4.0	8.0/8.0	4.0/8.0	1.0/4.0	1.0/4.0	4.0/>16.0	64.0/>64.0	
	LMS 02	0.125/8.0	0.25/8.0	0.5/>16.0	0.5/2.0	0.5/>16.0	1.0/16.0	4.0/8.0	
	LMS 38	8.0/>16.0	4.0/8.0	>16.0/>16.0	2.0/4.0	2.0/>16.0	>16.0/>16.0	64.0/>64.0	
	Geometric median (min– max)	0.595 (0.125– 8.0)/>8.0 (4.0 to >16.0)	>0.706 (0.062– >16.0)/>11.314 (8.0 to >16.0)	0.841 (0.5– 2.0)/11.314 (4.0 to >16.0)	1.0 (0.125– 8.0)/9.514 (8.0– 16.0)	1.189 (0.5– 2.0)/4.0 (2.0– 8.0)	1.682 (0.5– 4.0)/>16.0 (16.0 to >16.0)	>1.682 (0.25 to >16.0)/9.514 (4.0 to >16.0)	13.454 (2.0– 64.0)/>38.055 (8.0 to >64.0)
		0.595 (0.125– 8.0)/>8.0 (4.0 to >16.0)	>0.706 (0.062– >16.0)/>11.314 (8.0 to >16.0)	0.841 (0.5– 2.0)/11.314 (4.0 to >16.0)	1.0 (0.125– 8.0)/9.514 (8.0– 16.0)	1.189 (0.5– 2.0)/4.0 (2.0– 8.0)	1.682 (0.5– 4.0)/>16.0 (16.0 to >16.0)	>1.682 (0.25 to >16.0)/9.514 (4.0 to >16.0)	13.454 (2.0– 64.0)/>38.055 (8.0 to >64.0)
		0.595 (0.125– 8.0)/>8.0 (4.0 to >16.0)	>0.706 (0.062– >16.0)/>11.314 (8.0 to >16.0)	0.841 (0.5– 2.0)/11.314 (4.0 to >16.0)	1.0 (0.125– 8.0)/9.514 (8.0– 16.0)	1.189 (0.5– 2.0)/4.0 (2.0– 8.0)	1.682 (0.5– 4.0)/>16.0 (16.0 to >16.0)	>1.682 (0.25 to >16.0)/9.514 (4.0 to >16.0)	13.454 (2.0– 64.0)/>38.055 (8.0 to >64.0)
		0.595 (0.125– 8.0)/>8.0 (4.0 to >16.0)	>0.706 (0.062– >16.0)/>11.314 (8.0 to >16.0)	0.841 (0.5– 2.0)/11.314 (4.0 to >16.0)	1.0 (0.125– 8.0)/9.514 (8.0– 16.0)	1.189 (0.5– 2.0)/4.0 (2.0– 8.0)	1.682 (0.5– 4.0)/>16.0 (16.0 to >16.0)	>1.682 (0.25 to >16.0)/9.514 (4.0 to >16.0)	13.454 (2.0– 64.0)/>38.055 (8.0 to >64.0)

MIC minimal inhibitory concentration, MFC minimal fungicidal concentration

Trevors 2010); for example, the ability of *C. haemulonii* and *C. dermatis* to grow in conditions of 37 and 39 °C, respectively. The dynamic nature of host–pathogen interactions means that certain diseases can leave patients asymptomatic or with severe acute symptoms, depending on individual hosts and niches (Chagas-Neto et al. 2008; Hoskisson and Trevors 2010).

Growth at high temperatures is a major component of pathogenesis (Polvi et al. 2015). Many of the necessary genes for growth at elevated temperatures are virulence genes. In addition to the work of (Ramos et al. 2015) on clinical isolates, all of our isolates of *C. haemulonii* are strong producers of proteases and were negative for the production of phospholipase.

There are no records in the literature regarding the antifungal activity of environmental strains of *C. haemulonii*. However, some studies have reported that this yeast can cause human infection, mainly fungemia (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Xess et al. 2007; Kim et al. 2009, 2011; de Almeida et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Shin et al. 2012; Silva et al. 2015). Other studies have reported cases of *C. haemulonii* infection of the ear (Kim et al. 2009), bone (Crouzet et al. 2011), peritoneum (Yuvaraj et al. 2014), skin (Ramos et al. 2015) and isolation of catheter (Giusiano et al. 2006). Clinical isolates of *C. haemulonii* are resistant to many antifungal agents, mainly to amphotericin B and azoles. Echinocandins had lower MICs than other classes of antifungals in some studies (Kim et al. 2009; de Almeida et al. 2012), although resistance to theirs has already been cited (Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012) and the treatment of infections caused by this *Candida* species is an increasingly important therapeutic problem.

The results of the current study are similar those reported by authors that evaluated clinical strains, both being resistant to: amphotericin B (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; de Almeida et al. 2012; Shin et al. 2012; Melhem et al. 2013; Ramos et al. 2015; Silva et al. 2015); fluconazole (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Melhem et al. 2013; Ramos et al. 2015); itraconazole (Crouzet et al. 2011; Cendejas-Bueno et al. 2012; Oberoi et al. 2012); voriconazole; and posaconazole (Cendejas-Bueno et al. 2012). Some studies have indicated that clinical isolates are more sensitive (compared with our environmental isolates) to: amphotericin B (Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012); fluconazole (de Almeida et al. 2012; Silva et al. 2015); itraconazole (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Kim et al. 2009; de Almeida et al. 2012); voriconazole (Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; de Almeida et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Melhem et al. 2013; Silva et al. 2015); and posaconazole (de Almeida et al. 2012). We observed

that environmental strains of *C. haemulonii* were resistant to terbinafine, although no other studies have tested this antifungal against this species. However, ketoconazole and tioconazole showed lower MICs compared with the other antifungal MICs, and once again, no studies testing these antifungals were found in the literature.

We recorded a high concentration of MFCs. We found only one study evaluating MFC in the literature, testing amphotericin B against *C. haemulonii* (Rodero et al. 2002), with similar results to those reported in the current study (MFC > 8 µg/mL). Our MIC and MFC results indicate that environmental strains of *C. haemulonii* can be multiresistant before human infection. Therefore, the correct identification of *Candida* species and the evaluation of their sensitivity to antifungals are necessary steps in the search for cures for infections caused by this yeast.

For *C. dermatis* strains, MICs of ketoconazole, voriconazole, itraconazole, posaconazole and fluconazole obtained for LMPV 109 and LMS 02 (the two more susceptible strains) are similar to the MICs reported in studies using clinical isolates (Chagas-Neto et al. 2009; Arabatzis et al. 2014; Iturrieta-Gonzalez et al. 2014; Taverna et al. 2014). The MICs of amphotericin B for LMS 02 (Iturrieta-Gonzalez et al. 2014) and terbinafine for LMPV 109 (Taverna et al. 2014) were also similar to other studies. However, LMPV 90 and LMS 38 were less susceptible to all antifungals tested as compared to clinical isolates (Chagas-Neto et al. 2009; Fan et al. 2011; Arabatzis et al. 2014; Iturrieta-Gonzalez et al. 2014; Taverna et al. 2014). For the strain LMPV 90, the MICs obtained for tioconazole, terbinafine, fluconazole and posaconazole were high indicating that this isolate is resistant to these antifungals, although there is no standardization of sensitivity to antifungals for the genus *Cutaneotrichosporon*. Accordingly, LMS 38 is resistant to all antifungal agents tested. High MFCs can indicate that the treatment could be difficult for immunodeficient patients that may acquire infections from these environmental samples.

In summary, our study demonstrates that environmental samples of *C. haemulonii* and *C. dermatis* have the potential to cause human infections, due their capacity to produce some important enzymes related to human tissues and their ability to grow in near human body temperature. We also show that these yeasts may already be resistant to several antifungal agents commonly used in clinical practice. Due to this, choice of the treatments infections caused by these yeasts should be based on antifungal response of the isolate.

Acknowledgments The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) by process numbers 475378/2013-0 and 408718/2013-7 and FAPEAL (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Alagoas). The authors also thank Dr. Richard Ladle and Dr. Ana Malhado for editing the English.

References

- Al-Sweih N, Khan Z, Khan S, Devarajan LV (2009) Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. *Mycoses* 52:518–523. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01637.x
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Angelakis E, Raoult D (2014) Methods for the discovery of emerging pathogens. *Microb Pathog* 77:114–118. doi:10.1016/j.micpath.2014.06.007
- Arabatzi M et al (2014) Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of *Trichosporon* clinical isolates from Greece. *Clin Microbiol Infect* 20:777–783. doi:10.1111/1469-0691.12501
- Atlas RM, Parks LC (1993) Handbook of microbiological media. CRC Press, London
- Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* 93:1020–1025
- Cendejas-Bueno E et al (2012) Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (C. haemulonii Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (C. haemulonii Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol* 50:3641–3651. doi:10.1128/JCM.02248-12
- Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL (2008) Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 166:121–132. doi:10.1007/s11046-008-9136-x
- (CLSI) CaLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, vol 3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Approved Standard M27-A3, Wayne
- Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo AS, Colombo AL (2009) Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 47:1074–1081. doi:10.1128/JCM.01614-08
- Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM (2011) Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clin Microbiol Rev* 24:682–700. doi:10.1128/CMR.00003-11
- Crouzet J, Sotto A, Picard E, Lachaud L, Bourgeois N (2011) A case of *Candida haemulonii* osteitis: clinical features, biochemical characteristics, and antifungal resistance profile. *Clin Microbiol Infect* 17:1068–1070. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03471.x
- D vila AM, Steindel M, Grisard EC (2004) Tropical diseases, pathogens, and vectors biodiversity in developing countries: need for development of genomics and bioinformatics approaches. *Ann N Y Acad Sci* 1026:41–46. doi:10.1196/annals.1307.005
- de Almeida JN et al (2012) First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics* 67:1229–1231. doi:10.6061/clinics/2012(10)18
- Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S (2014) Non-albicans candida infection: an emerging threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014:615958. doi:10.1155/2014/615958
- Diezmans S, Cox CJ, Seh nian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG (2004) Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol* 42:5624–5635. doi:10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004
- Ebert D, Bull JJ (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends Microbiol* 11:15–20
- Fan YM, Huang WM, Yang YP, Li W, Li SF (2011) Primary cutaneous trichosporonosis caused by *Trichosporon dermatis* in an immunocompetent man. *J Am Acad Dermatol* 65:434–436. doi:10.1016/j.jaad.2010.01.020
- Fekkar A et al (2009) Serum cross-reactivity with *Aspergillus galactomannan* and cryptococcal antigen during fatal disseminated *Trichosporon dermatis* infection. *Clin Infect Dis* 49:1457–1458. doi:10.1086/644499
- Ferreira N, Belloch C, Querol A, Manzaneres P, Vallez S, Santos A (2010) Yeast microflora isolated from Brazilian cassava roots: taxonomical classification based on molecular identification. *Curr Microbiol* 60:287–293. doi:10.1007/s00284-009-9539-z
- Formoso A et al (2015) Enzymatic activity and susceptibility to antifungal agents of Brazilian environmental isolates of *Hor-taeta werneckii*. *Mycopathologia* 180:345–352. doi:10.1007/s11046-015-9920-3
- Gadanhó M, Sampaio JP (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the mid-atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microb Ecol* 50:408–417. doi:10.1007/s00248-005-0195-y
- Giudice MC, Reis-Menezes AA, Rittner GM, Mota AJ, Gambale W (2012) Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. *Braz J Microbiol* 43:895–902. doi:10.1590/S1517-83822012000300007
- Giusiano G, Mangiaterra M, Garcia Saito V, Rojas F, G mez V, D az MC (2006) Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. *Chemotherapy* 52:254–259. doi:10.1159/000094867
- Hagler AN, Mendon a-Hagler LC (1991) A *Diazonium Blue B* test for yeasts grown three days on yeast carbon base-urea agar. *Rev Microbiol* 22:71–74
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597–607
- Hashino S et al (2013) Fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia. *Blood Res* 48:154–156. doi:10.5045/br.2013.48.2.154
- Hobson RP (2003) The global epidemiology of invasive *Candida* infections—is the tide turning? *J Hosp Infect* 55:159–168
- Hoskisson PA, Trevors JT (2010) Shifting trends in pathogen dynamics on a changing planet. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:423–427. doi:10.1007/s10482-010-9485-6
- Iturrieta-Gonz lez IA, Padovan AC, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AL (2014) Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One* 9:e109553. doi:10.1371/journal.pone.0109553
- Johnson E (2009) Rare and emerging *Candida* species. *Curr Fungal Infect Rep* 3:152–159. doi:10.1007/s12281-009-0020-z
- Khan ZU et al (2007) Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol* 45:2025–2027. doi:10.1128/JCM.00222-07
- Kim MN et al (2009) *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis* 48:e57–e61. doi:10.1086/597108
- Kim S, Ko KS, Moon SY, Lee MS, Lee MY, Son JS (2011) Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. *J Korean Med Sci* 26:297–300. doi:10.3346/jkms.2011.26.2.297
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331–371
- Liu XZ et al (2015) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol* 81:85–147

- Lopez-Martinez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, Hernandez-Tovar LJ, Hernandez-Hernandez F (1994) Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev Latinoam Microbiol* 36:17–20
- Melhem MS, Bertoletti A, Lucca HR, Silva RB, Meneghin FA, Szesz MW (2013) Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Braz J Microbiol* 44:1257–1266. doi:10.1590/S1517-83822014005000018
- Merseguel KB et al (2015) Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infect Dis* 15:57. doi:10.1186/s12879-015-0793-3
- Miceli MH, Diaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11:142–151. doi:10.1016/S1473-3099(10)70218-8
- Montville TJ (1983) Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl Environ Microbiol* 45:200–204
- Muro MD, FeA Motta, Burger M, Melo AS, Dalla-Costa LM (2012) Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients. *J Clin Microbiol* 50:3783–3785. doi:10.1128/JCM.01136-12
- Oberoi JK, Watal C, Goel N, Raveendran R, Datta S, Prasad K (2012) Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res* 136:997–1003
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2009) *Candida ogatae* sp. nov., an anamorphic member of the *Kuraishia* clade. *FEMS Yeast Res* 9:328–333. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00466.x
- Polvi EJ, Li X, O'Meara TR, Leach MD, Cowen LE (2015) Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 72:2261–2287. doi:10.1007/s00018-015-1860-z
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7–14
- Ramos LS, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB (2015) Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 32:122–125. doi:10.1016/j.riam.2014.01.003
- Rodero L et al (2002) Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. *J Clin Microbiol* 40:2266–2269
- Rochel R, Tegeler R, Trost M (1982) A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:233–244
- Scott JA, Untereiner WA (2004) Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Med Mycol* 42:239–246
- Shin JH et al (2012) Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 50:1852–1855. doi:10.1128/JCM.06440-11
- Silva CM et al (2015) Neonatal Candidemia caused by *Candida haemulonii*: case report and review of literature. *Mycopathologia* 180:69–73. doi:10.1007/s11046-015-9872-7
- Slifkin M (2000) Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 38:4626–4628
- Smith HL, Goodner K (1958) Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J Bacteriol* 76:662–665
- Stopiglia CD, Vieira FJ, Mondadori AG, Oppe TP, Scrofermeyer ML (2011) In vitro antifungal activity of dihydroxyacetone against causative agents of dermatomycosis. *Mycopathologia* 171:267–271. doi:10.1007/s11046-010-9370-x
- Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T (2001) Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1221–1228. doi:10.1099/00207713-51-3-1221
- Taverna CG, Cordero S, Murisengo OA, Vivot W, Davel G, Boscoborget ME (2014) Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. *Med Mycol* 52:356–366. doi:10.1093/mmy/myt029
- van Uden N, Kolipinski MC (1962) *Torulopsis haemulonii* nov. spec. a yeast from the Atlantic ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek* 28:78–80. doi:10.1007/BF02538724
- Xess I, Jain N, Hasan F, Mandal P, Banerjee U (2007) Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. *Infection* 35:256–259. doi:10.1007/s15010-007-6144-6
- Xu W, Pang KL, Luo ZH (2014) High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean. *Microb Ecol* 68:688–698. doi:10.1007/s00248-014-0448-8
- Yuvaraj A, Rohit A, Koshy PJ, Nagarajan P, Nair S, Abraham G (2014) Rare occurrence of fatal *Candida haemulonii* peritonitis in a diabetic CAPD patient. *Ren Fail* 36:1466–1467. doi:10.3109/0886022X.2014.944067