



**MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA**

CAMILA DOS SANTOS FÉLIX E SILVA

DIVERSIDADE DE VIBRIOS ASSOCIADOS A RODOLITOS

**ARRAIAL DO CABO / RJ
2019**

CAMILA DOS SANTOS FÉLIX E SILVA

DIVERSIDADE DE VIBRIOS ASSOCIADOS A RODOLITOS

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cristiane C. Thompson
Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano L. Thompson

**ARRAIAL DO CABO / RJ
2019**

CAMILA DOS SANTOS FÉLIX E SILVA

DIVERSIDADE DE VIBRIOS ASSOCIADOS A RODOLITOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marina.

COMISSÃO JULGADORA:

**Cristiane Carneiro Thompson - Orientadora
(UFRJ)**

**Fabiano Lopes Thompson – Co-orientador
(UFRJ)**

**Ricardo Coutinho – Titular interno
(IEAPM)**

**Renato Crespo Pereira – Titular externo
(UFF)**

**Lohengrin Dias de Almeida Fernandes – Suplente
(IEAPM)**

Arraial do Cabo, 25 de fevereiro de 2019.

Primeiramente a Deus, por nunca ter me abandonado nos momentos difíceis dessa jornada. E as mulheres mais incríveis e guerreiras da minha vida: minha mãe Berenice, minha avó Sinhá e minhas tias Rita, Marli e Lêda.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo o seu amor e cuidado para comigo.

A minha mãe Berenice, por sempre está presente em todos os momentos da minha vida. Por todo o seu amor, carinho, educação, respeito, força, dedicação, fidelidade, confiança, loucura, desentendimento e principalmente por todo o seu apoio, sem ela eu não seria a metade da mulher que sou.

A minha vózinha Benedita e as minhas tias-avós Rita e Marli, por serem as mulheres mais extraordinariamente incríveis que conheci na minha vida. E principalmente por me fornecerem todo o mimo que uma pessoa é capaz de receber em uma vida.

A meu pai por todo o amor e orgulho que sente por mim.

Ao meu avô Paulo, por ter plantado o amor pela leitura na minha vida.

A minha tia Lêda e sua família por ter sido meu suporte durante esse meu período no mestrado.

A todos os meus tios e primos por todas as vezes que me acolheram, ajudaram e torceram por mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristiane Thompson, pela paciência, pelo incentivo, pelo ensinamento, e por todos os lanches e conversas antes das aulas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabiano Thompson, por ter me acolhido e principalmente por ter me dado a oportunidade de vivenciar novas experiências nesse mundo da Microbiologia Marinha.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia da UFRJ, agradeço a cada um de vocês por terem me apoiado por essa caminhada. Agradecimento em especial a Maria Soares, Luciana Reis, Taina Veras, Raphael Paixão, Lívia Vidal e Juline Walter por suportarem meus surtos e principalmente por toda a cumplicidade durante esse período.

Aos meus amigos da Pós-graduação Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira em especial a Inara Regina, Sarah Cantarino, Mariana Lima e Matheus

Pacheco, não poderiam ter escolhido pessoas melhores para entrar nessa jornada comigo.

A meus amigos do peito: Karoline Freitas, Jéssica Saboia, Fabiano Nascimento, Mikael Moraes, Luan de Alencar, Luana Guimarães, Amanda Joyce, Sayonara Barros por terem torcido pelo meu sucesso como se fossem deles.

Aos professores da Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do IEAPM por todos os ensinamentos proporcionados até aqui.

Aos membros da Banca, agradeço a presença e por terem aceitado participar deste momento único da minha carreira.

A agência de fomento CNPq agradeço pela bolsa concedida.

*“Não há vergonha em não saber. A
vergonha está em não descobrir”*

(Provérbio russo)

RESUMO

O Banco dos Abrolhos cobre uma área de aproximadamente 48,000 km². Contém um dos maiores e mais ricos complexos de recifes de coral do Atlântico Sul Ocidental. O banco de rodolitos compõe o maior megahabitat presente no Banco de Abrolhos, com extensão de aproximadamente 21.000 km. Rodolitos são estruturas calcárias composto em sua maioria (> 50%) de algas vermelhas coralinas não-geniculadas. Os rodolitos associam-se a um diverso consórcio microbiano, que desempenham um papel fundamental no seu funcionamento. Tendo em vista a importância de compreender melhor a microbiota e sua interação com os rodolitos, este trabalho teve o objetivo de analisar genômica a diversidade das bactérias (vibrios) isoladas dessas estruturas calcárias e entender sua atuação nesse holobionte. Estirpes de vibrio foram isoladas de rodolitos coletados de Buracas, a 43m de profundidade em Abrolhos. Uma coleção de 99 isolados bacterianos puros (G1 – G99) foi estabelecida, cuja a prévia posição taxonômica destes foram determinadas pelo gene *pyrH*. Duas bactérias dessa coleção (G62^T e G98^T) apresentaram potencial de serem espécies novas. Seus genomas foram sequenciados, onde passaram por análises de taxonomia genômica e caracterização fenotípica *in silico* para serem classificadas taxonomicamente. Suas cepas passaram por análises comparativas utilizando plataformas de bioinformática como o RAST e o antiSMASH, em busca de genes e metabolismos de interesse biotecnológicos. Com base nos resultados apresentados neste estudo, conclui-se que as linhagens G62^T e G98^T são novas espécies do gênero *Vibrio*: *Vibrio maerlii* sp. nov. e *Vibrio rhodolitus* sp. nov. foram propostos, respectivamente. A caracterização fenotípica *in silico* mostrou que sacarose, celobiose, D-manitol e D-manose diferenciam G62^T e G98^T das espécies mais próximas. Ambos apresentam cluster gênicos para bacteriocina, biotina e auxina. G98^T também apresenta metabolismo secundário para a produção de ectoína. G62^T apresentou cluster gênicos referentes a degradação de ureia, um dos metabolismos mais estudados nas bactérias para o processo de biomineralização. Induzindo que esta bactéria pode participar no processo de precipitação do carbonato de cálcio presente nos rodolitos.

Palavras-chave: *Vibrio*; Taxonomia Genômica; Coleção Bacteriana; Rodolitos; Diversidade Microbiana; Buracas; Banco dos Abrolhos; Metabólitos Secundários; Biomineralização;

ABSTRACT

The Abrolhos' Bank covers an area of approximately 48,000 km². Contains one of the largest and richest coral reef complexes in the Western South Atlantic. The bank of rhodoliths composes the largest megahabitat present in Abrolhos' Bank, with an extension of approximately 21,000 km. Rhodoliths are limestone structures composed mostly (> 50%) of non-geniculate red coral algae. Rhodoliths associated with a diverse microbial consortium, which play a key role in its functioning. Considering the importance of a better understanding of the microbiota and its interaction with rhodoliths, this work had the objective of genomic analysis of the diversity of the bacteria (vibrios) isolated from these limestone structures and to understand their performance in this holobionte. *Vibrio* strains were isolated from rhodoliths collected from Buracas, 43m deep in Abrolhos. A collection of 99 pure bacterial isolates (G1 - G99) was established, whose prior taxonomic position were determined by the *pyrH* gene. Two bacteria of this collection (G62^T and G98^T), presented potential to be new species. Their genomes were sequenced, where they underwent analyzes of genomic taxonomy and phenotypic characterization *in silico* to be classified taxonomically. Their strains have undergone comparative analysis using bioinformatics platforms such as RAST and antiSMASH, in genes and metabolisms of biotechnological interest. Based on the results presented in this study, we conclude that the G62^T and G98^T strains are new species of the genus *Vibrio*: *Vibrio maerlii* sp. nov. and *Vibrio rhodolitus* sp. nov. were proposed, respectively. The *in silico* phenotypic characterization showed that sucrose, cellobiose, D-mannitol and D-mannose differentiate G62^T and G98^T from the closest species. Both present clusters for bacteriocin, biotin and auxin. G98^T also has secondary metabolism for the production of ectoin. G62^T presented clusters of genes related to the degradation of urea, one of the most studied metabolisms in bacteria for the biomineralization process. Indicating that this bacterium can participate in the process of precipitation of the calcium carbonate present in the rhodoliths.

Keywords: *Vibrio*; Genomic Taxonomy; Bacterial Collection; Rhodolith; Microbial Diversity; Sinkhole Abrolhos Bank; Metabolic Secondary; Biomineralization;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. BANCO DOS ABROLHOS	11
1.1.1. Banco de Rodolitos	13
1.1.2. Buracas	16
1.2. TAXONOMIA BACTERIANA	17
1.3. DIVERSIDADE MICROBIANA	20
1.3.1. Gênero <i>Vibrio</i>	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. LOCAL E COLETA DAS AMOSTRAS	25
3.2. ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS	25
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	26
3.4. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO	28
3.5. ANÁLISES FILOGENÉTICAS	28
3.6. ANÁLISES DE TAXONOMIA GENÔMICA	29
3.7. ANÁLISES FENOTÍPICAS	30
3.7.1. <i>IN SILICO</i>	30
3.7.2. <i>IN VITRO</i>	30
3.8. BUSCA POR GENES E METABOLISMOS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	30
4. RESULTADOS	31
4.1. DIVERSIDADE DE VIBRIOS ISOLADOS DE RODOLITOS	31
4.2. ANÁLISES GENÔMICA	33
4.3. ANALISES FILOGENÉTICAS	34
4.4. TAXONOMIA GENÔMICA	37

4.5. DIAGNÓSTICO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS BASEADAS NO GENOMA	39
4.6. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ANALISADAS <i>IN VITRO</i>	41
4.7. METABOLISMO SECUNDÁRIO E GENES DE INTERESSE	41
4.8. DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES DE VÍBRIOS	44
4.8.1. Descrição do <i>Vibrio maerlii</i> sp. nov.	44
4.8.2. Descrição do <i>Vibrio rhodolitus</i> sp. nov.	44
5. DISCUSSÃO	45
5.1. DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES DE VÍBRIOS	45
5.2. BUSCA POR GENES E ATIVIDADES METABÓLICAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	48
6. CONCLUSÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICE A – LISTA DE ESPÉCIES	61
APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DE GENES ENCONTRADOS NA CEPA VIBRIO G62^T RELACIONADOS A DECOMPOSIÇÃO DE UREIA.	64
APÊNDICE C – ARTIGO DE DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES <i>Vibrio maerlii</i> sp. nov. E <i>Vibrio rhodolitus</i> sp. nov.	68

1. INTRODUÇÃO

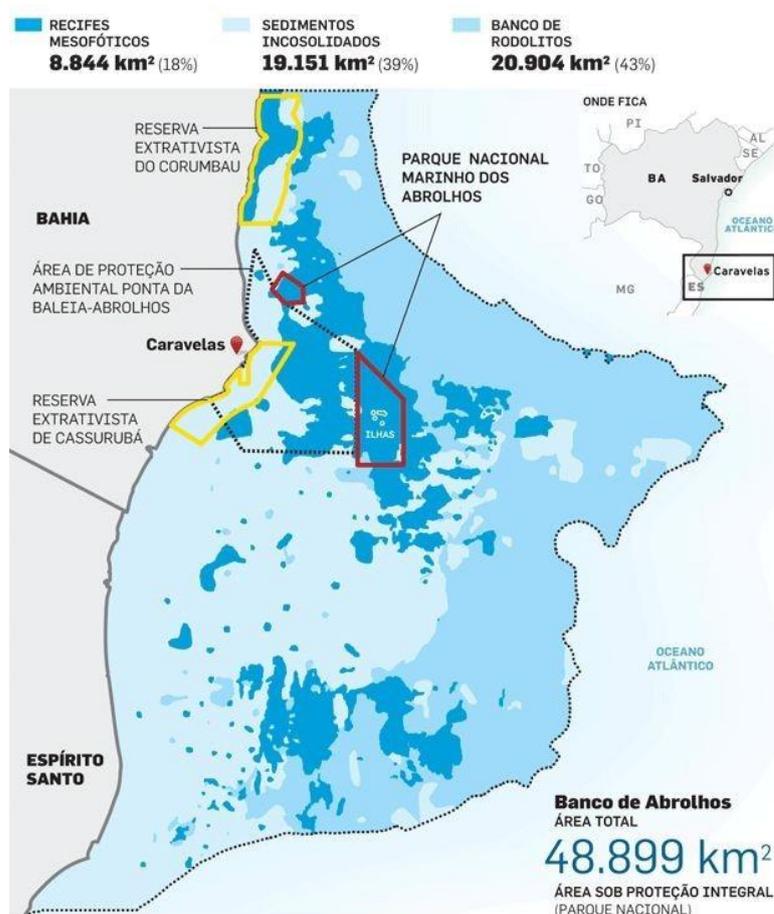
1.1. BANCO DOS ABROLHOS

O Banco dos Abrolhos fica localizado ao Sudoeste do Estado da Bahia e se estende por toda a plataforma continental do leste do Brasil, cobrindo uma área de aproximadamente 48,000 km² (17°20'-18°10'S e 38°35'-39°20'O), a uma distância de aproximadamente 70 km da costa (Figura 1) (Leão, 1999; Knoppers *et al.*, 1999; Remac, 1979). Contém um dos maiores e mais ricos complexos de recifes de coral de todo o Atlântico Sul Ocidental, conhecido por seu conjunto de corais tomado por espécies endêmicas brasileiras (Leão & Ginsburg, 1997). Abrigando diversas espécies de mamíferos, tartarugas, peixes e invertebrados marinhos ameaçados de extinção. Representa a principal área de reprodução de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) no Atlântico Sul, abrigando também um conjunto significativo de espécies ameaçadas e de distribuição restrita, tais como o coral-cérebro (*Mussismilia braziliensis*) (Hilton-Taylor, 2000; Moura e Lopes, 2009). Compreende um mosaico de megahabitats (Figura 2) com alto nível de biodiversidade que se distribui desde a região costeira até a quebra da plataforma. Composta por manguezais, recifes rasos costeiros e externos, recifes mesofóticos externos, sedimentos inconsolidados, um dos maiores bancos de rodólitos do mundo, estruturas parecidas como sumidouro denominada de Buracas e o Talude (Secchin, 2011; Amado Filho *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2013). Esse mosaico de megahabitats interconectados ecologicamente suporta uma alta diversidade, com um arranjo dinâmico desempenhando um papel fundamental na manutenção de muitas comunidades biológicas associadas, provendo vários bens e serviços naturais que são vitais para o bem-estar e sobrevivência humana. Portanto, influenciando na dinâmica econômica e social da costa leste brasileira, especialmente na pesca, uma das principais atividades produtivas dessa região (Paiva e Fonteles-Filho, 1997; Costa *et al.*, 2003; Bottécchia *et al.*, 1997; Roberts & Ormond, 1987; Myers, 1997; Jones & Syms, 1998; Moberg & Folke, 1999; Moberg & Rönnbäck, 2003). Mais de 40.000 pessoas dependem do uso direto dos recursos pesqueiros de Abrolhos, principalmente dos peixes recifais, lagostas e camarões, cujos estoques já apresentam sinais claros de declínio (Moura e Lopes, 2009).

Devido a sua grande importância ecológica, ambiental e socioeconômica, a região de Abrolhos foi deliberada um ecossistema preservado em 1983, se tornando

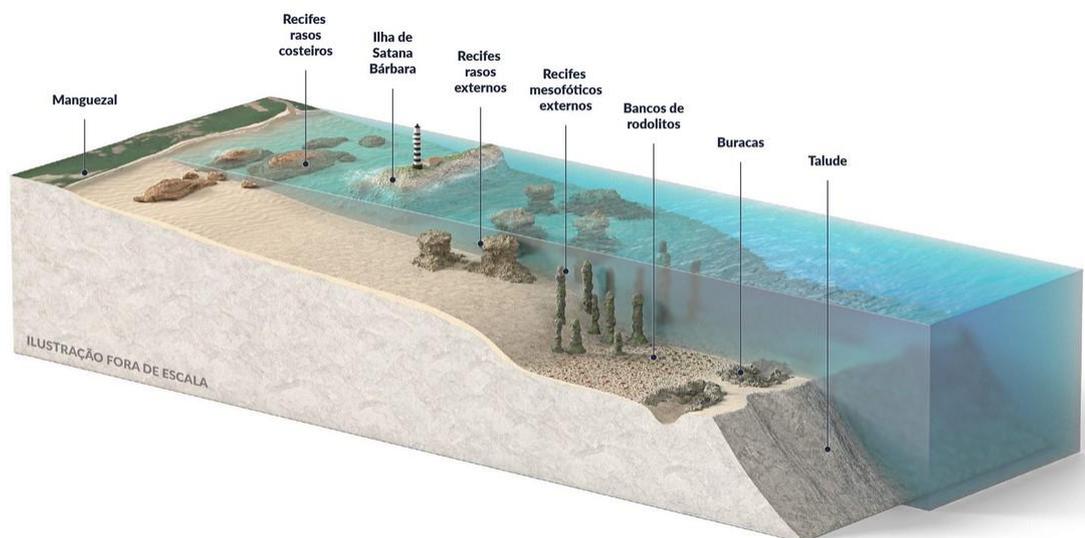
o primeiro Parque Marinho Nacional do Brasil, pelo Decreto nº 88.218, de 6 de abril de 1983 (Sumida *et al.* 2009; Moura & Lopes, 2009). Apesar da grande quantidade de dados que serve de apoio para a preservação desta região, ainda há uma grande carência de pesquisas nesses megahabitats para se obter uma melhor compreensão de sua dinâmica com o ecossistema e assim fornecer melhores medidas de como conservá-lo (Francini-Filho *et al.* 2008b; Bruce *et al.* 2012; Francini-Filho *et al.* 2013; Silveira *et al.* 2015). Contudo, a biodiversidade do Banco dos Abrolhos vem sofrendo cada vez mais com pressões antrópicas. Essa atuando de forma deletéria, esgotando recursos naturais e alterando os habitats, sem mensurar os prejuízos e conduzindo à perda de interações, acarretando no desaparecimento dos bens e serviços fornecidos, tais como a pesca, turismo, exploração de petróleo e gás, exploração dos rodolitos e da ocupação costeira desordenada. (Bryant *et al.*, 1998; Moberg & Folke, 1999; Kostylev *et al.*, 2001; Nyström & Folke, 2001, Loreau *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2001; Moberg & Rönnbäck, 2003; Bjorndal *et al.*, 2011, Cavalcanti, 2015).

Figura 1 – Mapa da região que comporta o Banco de Abrolhos.



FONTE: Adaptado de REDE ABROLHOS.

Figura 2 – Infográfico da variedade de ecossistemas marinhos presentes no Banco de Abrolhos.



FONTE: REDE ABROLHOS

1.1.1. Banco de Rodólitos

Rodólitos, também conhecidos como maerl, são estruturas calcárias em forma de nódulos (esféricos, discoides ou elipsoides) de vida livre compostas em sua maioria (> 50%) de algas vermelhas corálicas não-geniculadas (*Corallinales*, *Rhodophyta*) (Steneck, 1986; Foster, 2001; IBP, 2014). Rodólitos individuais podem formar estruturas ramificadas, e grandes agregações de rodólitos formam bancos, matrizes biogênicas complexas que criam inúmeros espaços intersticiais (Figura 3) (Jones *et al.*, 1994). Nesses bancos se formam comunidades de algas bentônicas ecologicamente importantes, onde a estrutura do rodólito fornece um substrato rígido tridimensional e serve como micro-habitat para uma grande diversidade de invertebrados e algas associadas (Foster *et al.*, 1997; Steller *et al.* 2003; Littler, 2008; Nelson, 2009). Os rodólitos, além de abrigarem uma abundante comunidade de invertebrados bentônicos, ocorrem em associação com diversas comunidades microbianas, que inclui bactérias, arqueias, vírus, fungos e protistas, os quais em conjunto com a macroalga formam o holobionte (Cavalcanti *et al.*, 2013b). Os micróbios associados aos holobiontes bênticos, como os corais, desempenham um papel fundamental na saúde e homeostase de seus hospedeiros (Rosenberg *et al.*,

2007), colaborando com sua adaptação e capacitação de desenvolver estratégias indisponíveis para qualquer outra espécie, quando desafiadas por perturbações ambientais. Apesar dos primeiros estudos sobre holobiontes terem sido realizados entre microrganismos marinhos e macroalgas (Barott & Rohwer, 2012) ainda faltam estudos que incluam o componente microbiano na compreensão da fisiologia do rodolito e de suas interações ecológicas (Cavalcanti *et al.*, 2013b).

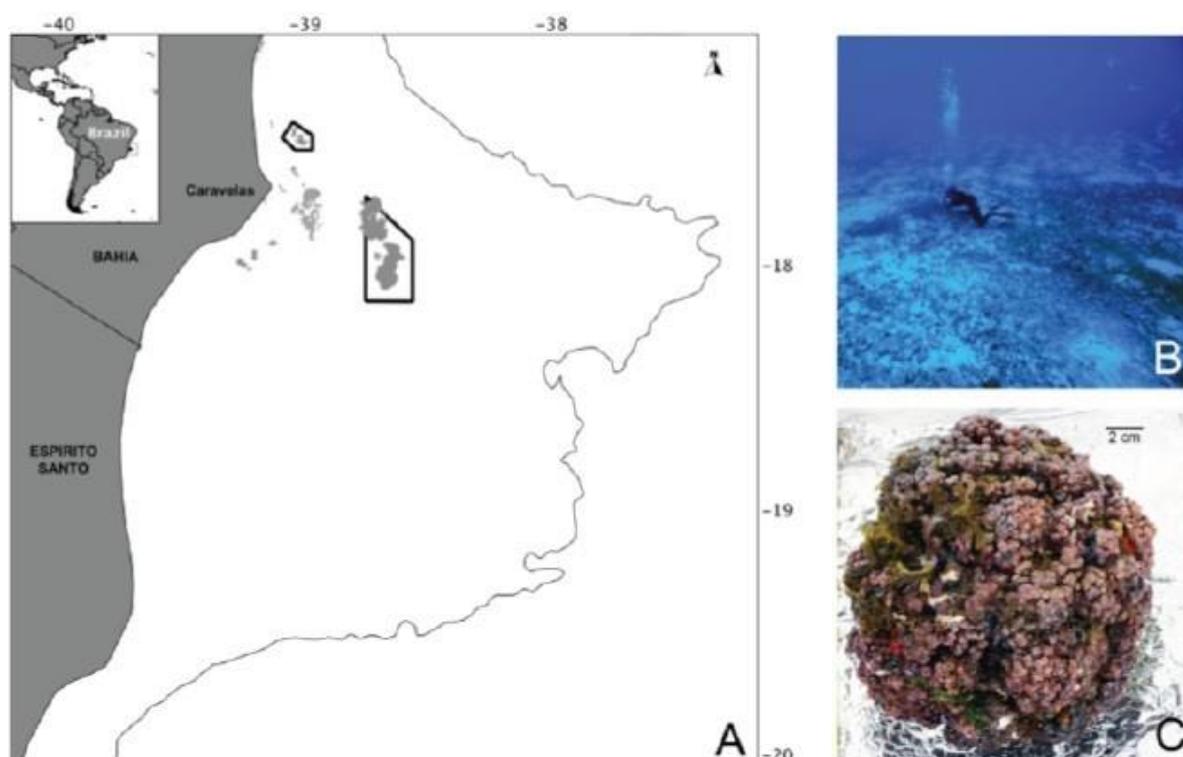
Os bancos de rodolitos são distribuídos mundialmente, dos trópicos aos polos, das zonas entre mares a profundidades de mais de 200 m (Littler *et al.*, 1991; Foster, 2001; Konar *et al.*, 2006). O banco de rodolitos compõe o maior megahabitat do Banco de Abrolhos, com extensão de 20.904 km² (Figura 3), equivalente a 43% da sua área mapeada, representando uma grande importância global na produção de carbonato de cálcio (chegando a fabricar 25 megatons de CaCO₃ por ano), comparável aos recifes coralíneos do Caribe e Grande Barreira de Corais da Austrália (Kempff, 1970; Milliman, 1977; Testa; Bosence, 1999; Foster, 2001; Amado-Filho *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2007; Amado-Filho *et al.*, 2012).

A combinação de uma plataforma tropical ampla e rasa com perturbação de ondas sazonais oferecem condições positivas para o desenvolvimento deste amplo banco de rodolitos (Bahia *et al.*, 2010). Os fundos de algas calcárias são sensíveis pela lenta habilidade de serem recuperados uma vez danificados, devido ao lento crescimento das algas calcárias, como aquelas construtoras de recifes. Neste cenário encontra-se o conceito de resiliência, que caracteriza a velocidade de 'recuperação', ou seja, a habilidade de voltar para uma determinada dinâmica sem a perda das partes/unidades ou processos ecológicos. Estudos sobre a resiliência dos bancos de rodolitos, todavia são escassos. (IBP, 2014). Por essa razão e por causa de sua suscetibilidade a danos causados pela atividade humana, os leitos de rodolitos são habitats protegidos na Europa em critério de sua importância ao declínio, sensibilidade e a significância, função, ecológica (Birkett *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2004; Nelson, 2009).

No Brasil, os primeiros estudos voltados para o banco de algas calcárias tiveram caráter geológico e estavam focados na caracterização dos sedimentos da plataforma continental (Kempff, 1970) e nas perspectivas de potencial exploração comercial deste recurso (Kempff, 1974; Milliman & Amaral, 1974). Apesar do vasto conhecimento sobre a ecofisiologia e biogeografia dos rodolitos, muitos poucos

estudos publicados sobre os bancos de rodolitos no Brasil têm abordado essas comunidades do ponto de vista biológico, incluindo informações consistentes sobre a estrutura desse banco, organismos associados e na identificação de algas vermelhas não-geniculadas (Testa, 1997; Testa; Bosence, 1999; Gherardi, 2004; Rocha *et al.*, 2006; Amado-Filho *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2007; Horta *et al.*, 2001; Riul *et al.*, 2009; Villas-Boas *et al.*, 2009). Principalmente em pesquisas voltadas para as comunidades microbianas, as estratégias metabólicas microbianas associadas aos ciclos biogeoquímicos e a biomineralização do CaCO_3 e o potencial de produtividade fotossintética dos rodolitos (Cavalcanti *et al.*, 2013b). Apesar das diversas pesquisas realizadas, atualmente o papel exato dos bancos de rodolitos em Abrolhos ainda é pouco compreendido (Amado-filho & Pereira-Filho, 2012; Bahia *et al.*, 2010).

Figura 3 - Ponto do estudo. (A) Banco de Abrolhos, ocupando um pouco mais 48.000 km^2 da plataforma continental do leste do Brasil, onde se localiza o maior banco de rodolito do mundo, cobrindo uma área de aproximadamente 21.000 km^2 . (B) Fisionomia do banco de rodolitos de Abrolhos. (C) Rodolitos monoespecíficos individuais.



FONTE: CAVALCANTI, 2015.

1.1.2. Buracas

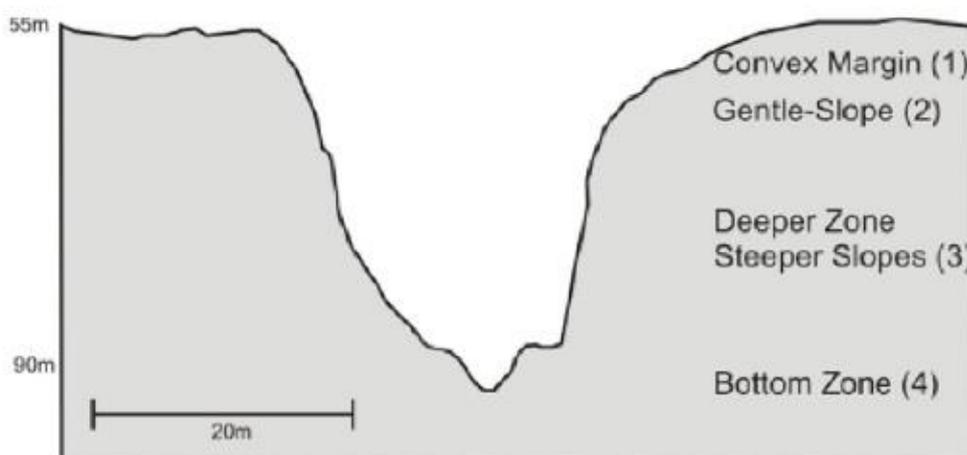
Buracas são estruturas em forma de taça encontradas no assoalho marinho onde se acumula uma grande quantidade de matéria orgânica, assim servindo como uma agregação de biomassa (Rede Abrolhos, 2016).

As numerosas estruturas semelhantes a sumidouros localizadas na costa leste do Brasil foram inicialmente descobertas por pescadores locais, sendo uma das principais áreas de pesca. As razões subjacentes para tais rendimentos crescentes de pesca eram inicialmente incertos, já que os pescadores também relataram diferentes cores e odores da água, um cheiro característico de “mangue” nestes pontos muito específicos. Embora as Buracas agreguem peixes (recifes e pelágicos) e lagostas, que são alvos importantes para a pesca comercial, essas estruturas se encontram fora da rede existente de Áreas Marinhas Protegidas no Parque de Abrolhos (Cavalcanti *et al.*, 2013a).

Estudos recentes, sobre o levantamento geográfico da região do Banco de Abrolhos, apontaram para um total de 36 estruturas de Buracas entre 41 e 161 km da costa, entre 24 e 65 m de profundidade (algumas chegando até alcançar 93 m de profundidade na sua parte inferior). Tendo sua parede composta praticamente por algas calcárias e seu fundo com macroalgas em decomposição e rodolitos mortos (Bastos *et al.* 2013).

No geral, as Buracas são divididas entre quatro zonas distintas (1 - Margem Convexa; 2 - Zona de Declive Suave; 3 - Zona Mais Profunda e a 4 - Zona Inferior): 1) gradualmente entremeada com o banco de rodolitos adjacente, algumas vezes com afloramentos calcários emergentes de até dois metros; 2) composta principalmente de calcário exposto incrustado por algas coralinhas (~ 30°, 55 - 60 m de profundidade) com alguma cobertura esparsa de rodolitos, manchas arenosas, corais e macroalgas; 3) com uma inclinação mais acentuada do calcário exposto (declive > 45°, 60-70 m) e, 4) com uma camada de matéria orgânica em decomposição abundante (principalmente macroalgas) sobre lama arenosa calcária e rodolitos mortos (Bastos *et al.* 2013) (Figura 4).

Figura 4 – Esquema das Zonas encontradas nas Buracas.



FONTE: Adaptado de CAVALCANTI, 2013a.

Essas estruturas proporcionam uma diversificação física adicional ao fundo de areia geralmente inexpressivo e, portanto, exercendo uma profunda influência na vida marinha de Abrolhos, pois além de fornecer novos habitats e locais de berçário para uma infinidade de organismos, elas concentram grandes quantidades de nutrientes inorgânicos, oferecendo nichos únicos para o crescimento microbiano, que supostamente poderiam influenciar áreas vizinhas, afetando até mesmo a estruturação de peixes e bentos (Cavalcanti, 2015).

1.2. TAXONOMIA BACTERIANA

A taxonomia é uma das áreas mais antiga da ciência, a qual estuda a identificação, a classificação e a nomenclatura dos organismos (Vandamme *et al.*, 1996). A identificação de um organismo é fundamental para conhecer sua biologia. Já a classificação está no entendimento implícito do que um organismo é capaz de fazer, baseado nas análises anteriores realizadas em organismos similares. E a nomenclatura consiste na aplicação de regras formais para a denominação de organismos seguindo o sistema binomial proposto por Lineu em 1758, onde cada organismo deve ser reconhecido por uma designação binomial, sendo o primeiro termo usado para designar o seu gênero e o segundo, a sua espécie (Lawrence & Retchless, 2009; Madigan *et al.*, 2016). A taxonomia produziu um sistema estável, previsível e altamente informativo que tem colaborado para o avanço de vários ramos da ciência, incluindo não somente a microbiologia, mas também a genômica, ciências

médicas, ecologia de microrganismos, biotecnologia, evolução e epidemiologia (Godfray, 2002). Portanto, a identificação e a classificação de qualquer organismo são de fundamental importância para a compreensão da sua biologia, servindo como guia aos pesquisadores para maior compreensão sobre grupos importantes de microrganismos e para o ambiente em que se encontram. (Thompson, 2009; Madigan *et al.*, 2016).

A taxonomia bacteriana ao passar do tempo e dos avanços tecnológicos foi substancialmente se modificando nas últimas décadas, incorporando novos métodos de identificação e critérios adicionais para a descrição de novas espécies (Madigan *et al.*, 2016). Inicialmente era baseada apenas nos dados morfológicos das colônias bacterianas, seguindo chaves dicotômicas de classificação, uma ferramenta herdada dos sistematas botânicos. Nesse sistema de classificação, os microrganismos, formavam grupos muito heterogênicos e artificiais, assim agrupando diversos organismos erroneamente. No início do século passado, testes fenotípicos foram inseridos no contexto taxonômico, aprimorando a taxonomia de procariontes. Com o avanço da computação, houve o surgimento da taxonomia numérica, onde ocorreu uma maior objetividade aos esquemas dessa classificação, analisando grandes quantidades de dados fenotípicos utilizando coeficientes numéricos que expressavam similaridade entre linhagens com o auxílio do computador (Sneath & Sokal, 1962; Priest & Austin, 1993).

Com os avanços nas áreas de bioquímica, bioinformática, biologia molecular, grandes avanços começaram a surgir efeito no ramo da taxonomia, sendo possível estabelecer sistemas mais próximos, no qual refletissem as relações evolutivas entre os organismos, aproximando a classificação microbiana o mais possível da realidade biológica (Hofling, 1997; Garcia & Chamas, 1996). Em 1970 houveram os primeiros estudos que analisaram não somente a morfologia e fisiologia dos organismos, mas também as características bioquímicas e genotípicas para sua identificação. A proposta e subsequente aplicação massiva da taxonomia polifásica a partir de 1970, com base no papel da técnica de hibridização de DNA-DNA (Colwell, 1970a), produziu grupos taxonômicos robustos que foram posteriormente posicionados no espaço filogenético com o auxílio de sequências do RNAr 16S. Em 1987, Carl Woese publicou seu trabalho sobre o uso de cronômetros filogenéticos, principalmente o gene RNAr 16S, que codifica a subunidade ribossomal menor do 16S em procariontes, como

ferramenta para a identificação de espécies bacterianas, o que mudou o rumo da taxonomia de procariotos (Woese, 1987). A esta abordagem, deu-se o nome de taxonomia polifásica, sendo este um divisor de águas para a taxonomia de procariontes. A taxonomia polifásica classifica os procariontes com base na integração de suas informações genotípicas, fenotípicas e filogenéticas. As características genotípicas são baseadas nos parâmetros genéticos dos organismos; os fenotípicos são baseados em funções e características expressas pelos genes; e a filogenia representa o estudo das relações evolutivas de cada grupo, posicionando-os sistematicamente de acordo com seus ancestrais em comum (Vandamme *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Gevers *et al.*, 2005).

Agora, devido ao avanço da era genômica, a taxonomia microbiana vem sofrendo mais uma revolução devido suas técnicas rápidas de sequenciamento de genomas completos e com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática que auxiliam nos tratamentos desses dados (Coenye *et al.*, 2005; Gevers *et al.*, 2005; Konstantinidis & Tiedje, 2005). O uso crescente da informação genética, especialmente os dados de sequenciamento do DNA, está permitindo que a taxonomia reflita cada vez mais as relações filogenéticas (Madigan *et al.*, 2016). A taxonomia genômica é definida com base em análises de dados comparando seqüências de genomas completos como Média de Identidade de Aminoácidos – AAI (Konstantinidis & Tiedje, 2005), assinatura genômica (Karlin *et al.*, 1997), uso de códons (Weight, 1990), super-árvores (Daubin *et al.*, 2001; Teeling *et al.* 2004) e MLSA - *Multi Locus Sequence Analysis* (Stackebrandt *et al.*, 2002) com objetivo de estabelecer a identificação e classificação microbiana a partir de informações contidas em cada genoma com base taxonômica e filogenéticas (Thompson, 2009).

De acordo com a taxonomia genômica, uma espécie de bactéria pode ser definida como um grupo de cepas que compartilham: valores maiores que 98.5% de similaridade com 16S rRNA, 95% de similaridade em MLSA, Média de Identidade de Nucleotídeos – ANI e AAI (Thompson *et al.* 2013) e 70% em Hibridação DNA-DNA (Meier-Kolthoff, Klenk & Göker, 2013).

Apesar de tradicionalmente a taxonomia bacteriana ter focado seus aspectos práticos de identificação e descrição em atividades baseadas predominantemente em comparações fenotípicas. A taxonomia genômica está aumentando recorrentemente e já existem novas espécies de bactérias descritas apenas pela análise do genoma

(Thompson *et al.* 2009; Ivanova *et al.* 2014; Appolinario *et al.* 2016; Walter *et al.* 2017; Nóbrega *et al.* 2018).

1.3. DIVERSIDADE MICROBIANA

Os microrganismos podem ser classificados e observados em diferentes reinos Biológicos, sendo amplamente distribuídos pela natureza. Ocorrem praticamente em qualquer ambiente do planeta, até naqueles onde a condição do local explora o limite e a tolerância de qualquer ser vivo. Isso devido a sua relativa simplicidade morfológica e da sua grande diversidade genética e metabólica, os capacitando a viver em qualquer tipo de habitat (Manfio, 2003). São os organismos mais numerosos em nosso planeta. Sua diversidade é tão vasta quanto desconhecida. Podendo possuir entre 0,1 e 10% das espécies microbianas reconhecidas, dependendo do habitat estudado (Quince *et al.* 2008; Kallmeyer *et al.* 2012). Eles representam o repertório mais rico em química e diversidade molecular na natureza, fornecendo a base para processos ecológicos, como ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, bem como manter relações vitais entre si e com organismos superiores (Hunter Cevera, 1998). A alta diversidade de microrganismos contribui para uma grande quantidade de informações que impulsionam estudos em diversas áreas como: agrícola, medicinal e industrial. No qual, muitos tipos de bactérias são exploradas para a síntese industrial, farmacêutica, biotecnológica de uma ampla gama de produtos (Tortora, 2010). Bactérias e outros micróbios desempenham um papel fundamental na saúde dos corais, com exemplos de relações simbióticas e patogênicas bem documentados (Rosenberg *et al.* 2007). Contribuem para a reciclagem de nutrientes como nitrogênio, enxofre e carbono nos ecossistemas. Outras vivem em associação simbiótica em nossa boca, nossos intestinos e em diversos organismos. Assim, o ímpeto da dissecação genética das bactérias tem sido o mesmo que o de organismos multicelulares, para compreender seu funcionamento biológico. (Griffiths, 2013).

A diversidade de microrganismos é fundamental para o funcionamento do ecossistema, pois há a necessidade de manter processos ecológicos como decomposição de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos no ecossistema (Kennedy 1999). A diversidade funcional é muito importante nas avaliações ecológicas de microrganismos no ecossistema,

principalmente porque pouco se sabe sobre a relação entre a diversidade estrutural e funcional desses microrganismos. Há, no entanto, um consenso de que a diversidade microbiana está diretamente relacionada à estabilidade do ecossistema (Yamanaka *et al.* 2003).

Apesar de sua grande importância ecológica, o número de táxons microbianos conhecidos e descritos (diversidade de espécies) representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (Manfio, 2003). Porém o conhecimento da diversidade microbiana passou por melhorias mais profundas devido às descobertas promovidas pelas novas tecnologias. Agora, os métodos baseados em bases moleculares tornaram-se parte integrante da ecologia microbiana, basicamente de um método dependente da cultura para um método independente. Mesmo assim, questões envolvendo a sistemática microbiana e sua taxonomia estão paradas há muito tempo. No entanto, apesar da resistência da inovação, vimos na literatura apelos bem articulados para a reforma dentro da sistemática microbiana (Hugenholtz *et al.* 2016; Gevers *et al.* 2005; Konstantinidis & Tiedje 2005; Gribaldo & Brochier-Armanet 2012; Sutcliffe *et al.* 2013; Garrity & Oren 2013). A disponibilidade de genomas completos oferece a oportunidade de reconstruir eventos de evolução genômica através da análise de classes funcionais inteiras (Koonin *et al.* 2000; Shi & Falkowski 2008), integrado ao conhecimento da composição genética, distribuição, identidade e também padrões ecológicos de cepas. É especialmente excitante para a matéria escura microbiana, que consistem dos genomas de micróbios e vírus que nunca foram vistos antes e que representam a maioria das sequências microbianas em todos os ambientes na Terra (Rinke *et al.* 2013).

A análise sequencial de comunidades microbianas inteiras cria uma oportunidade para descobrir uma infinidade de diferentes espécies bacterianas que podem ser exclusivas de fontes ambientais (Dubinsky *et al.*, 2012). As possibilidades das tecnologias de sequenciamento trouxeram excitação para o campo da genômica microbiana, liderando pesquisas que questionam comunidades microbianas. Muito tem sido feito, mas um dos grandes desafios da ciência do século 21, ainda é, entender a estrutura, funções, atividades e dinâmica das comunidades microbianas em ambientes naturais (Zhou *et al.* 2015).

1.3.1. Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio*, junto com outros seis gêneros (*Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium* e *Salinivibrio*) formam a família *Vibronaceae* (Sawabe *et al.* 2013). Teve sua primeira identificação (*Vibrio cholerae*) em 1854, quando o italiano Filippo Pacini pesquisava sobre o agente etiológico dos surtos de cólera ocorridos na região de Florença (Thompson, 2004). Atualmente, 147 espécies de *Vibrio* foram descritas, junto com suas diversas *strains* (<http://www.bacterio.net/vibrio.html>). Vibrios são bactérias bastante fáceis de serem isoladas de material clínico e ambiental, embora algumas espécies possam requerer fatores de crescimento ou de vitaminas. O meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose) é o mais utilizado para isolar e purificar vibrio de diversas variedades de fontes, sejam elas alimentos clínicos, ambientais ou contaminados (Thompson, 2004).

Vibrios são bactérias Gram-negativas, com forma de bastonete curvo, geralmente móveis, onde algumas espécies podem apresentar mais de um flagelo polar, mesofílico, quimio-organotrófico, oxidase positivas e possuem metabolismo fermentativo facultativo (Farmer, 1992; Farmer *et al.*, 2005). São bactérias ubíquas e abundantes no meio aquático, especialmente nas águas marinhas, podendo ser encontrada em vida livre ou associadas a algas e animais (Thompson & Polz, 2006; Urakawa & Rivera, 2006). Vários estudos mostram a predominância desse gênero em águas superficiais em todo o mundo, onde sua prevalência no ambiente é influenciada pela estação, localização e métodos analíticos empregados (Johnson *et al.* 2012). É um grupo de organismos com grande diversidade. Algumas espécies podem ser patogênicas não apenas em humanos, mas como em corais e outros organismos marinhos, por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *V. tubiashii*, e *Vibrio fluvial* (Hoffmann, 2010; Hassan, 2012). Outros podem formar biofilmes, como o exoesqueleto de crustáceos e outros organismos marinhos (Wai *et al.*, 1999; Lipp *et al.* 2002; Dave & O'toole, 2000), utilizando o mecanismo de *quorum sensing* como ferramenta de regulação e comunicação entre as células (Hammer & Bassler, 2003; Waters *et al.*, 2008). Atuam na ciclagem de nutrientes no ambiente aquático, consumindo matéria orgânica (Sherr & Sherr, 2002). Também são encontrados em associação simbiótica com outros organismos, como no caso do *Vibrio fischeri* e a lula bobtail havaiana, *Euprymna scolopes*, que cresce dentro do

órgão luminoso presente na lula, ajudando-a camuflar durante a parte da noite eliminando a sua sombra na coluna d'água (Verma & Miyashiro, 2013).

Como é claro, há uma grande variedade de usos para o *Vibrio* spp., Suas proteínas ou produtos, ou o aproveitamento de suas propriedades metabólicas específicas. Claramente, à medida que mais e mais espécies de *vibrio* são descobertas a partir de ambientes extremos e os mecanismos de sua biologia são elucidados, então o número e a complexidade de seus usos e aplicações também devem seguramente ser aumentados.

Por apresentarem diversas propriedades fisiológicas e por poderem ser encontrado em uma vasta gama de habitats ecológicos, os víbrios são considerados de importante estudo para potencial biotecnológico (Thompson *et al.*, 2006). No entanto, apesar de sua exploração biotecnológica permanecer em grande parte desconhecida, novas sequências do genoma completo e avanços na bioinformática podem embasar futuros desenvolvimentos em sua área de conhecimento biotecnológica e em engenharia metabólica (Covert *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade de vibrios associados a rodolitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma coleção de vibrios associados a rodolitos;
- Estabelecer a taxonomia genômica de vibrios associados a rodolitos;
- Ampliar o uso de diagnóstico fenotípico empregando genomas de vibrios marinhos;
- Analisar genomas de vibrios e investigar banco de sequências de genes com potencial biotecnológico.

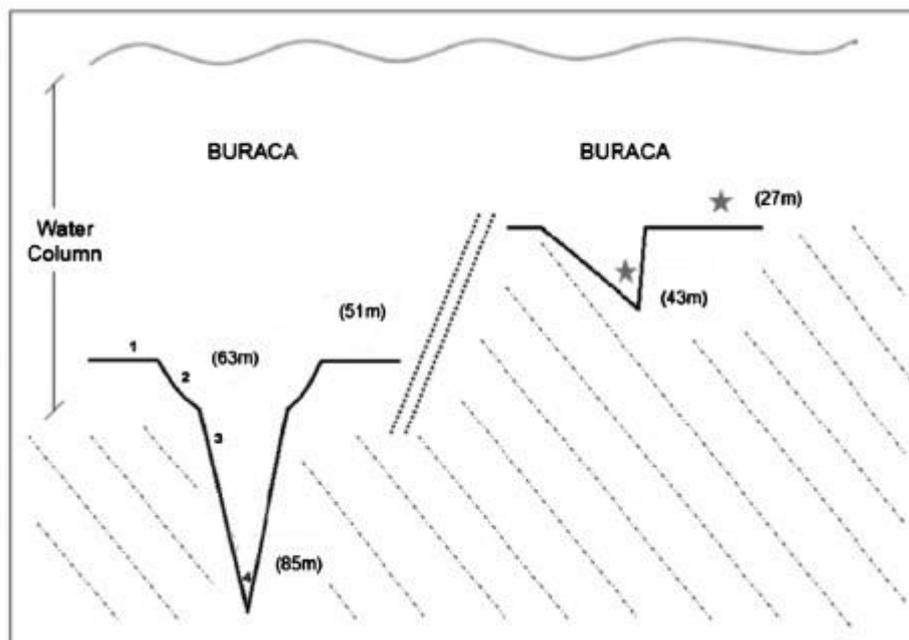
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL E COLETA DAS AMOSTRAS

Os rodolitos foram coletados através de técnicas de mergulho em dezembro de 2010 em dois locais distintos de uma das estruturas denominada de Buracas encontrada em Abrolhos, Bahia. Localizada a 115km *offshore*.

As Buracas onde os rodolitos foram coletados (Figura 5), tem sua parte mais rasa à 27m de profundidade, e sua parte mais profunda à 43m de profundidade com diâmetro de aproximadamente 40m (Cavalcanti *et al.* 2013a). Ao total foram coletados cinco rodolitos, sendo dois na região mais rasa ($S17.81330^{\circ}/W38.23744^{\circ}$) e os outros três na região mais profunda ($S17.81399^{\circ}/W38.24306^{\circ}$) das Buracas.

Figura 5: Demonstração de duas estruturas da Buracas, no qual foram coletadas os rodolitos. Pontos onde foram realizadas as coletas representado pelo desenho de estrela.



FONTE: Modificada de Cavalcanti, 2013a

3.2. ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As cepas de vibrios foram isoladas das estruturas de rodolitos. Segundo Cavalcanti (2013b), pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm de cada rodolito coletado foram macerados em 10 ml de solução salina estéril (3,0% NaCl). As alíquotas representativas do macerado foram plaqueadas no meio de cultura seletivo

TCBS - Agar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (Oxoid, Hampshire, UK). As placas foram incubadas a 28°C durante 48 h. Morfotipos de colônia representativos foram escolhidos para posterior purificação.

As culturas puras são mantidas em frascos com meio de cultura Marine Ágar com 20% de glicerol a - 80 °C preservados em triplicatas e depositados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Marinha – IB – UFRJ (Tabela 1). As bactérias dessa coleção (G62 e G98) que foram classificadas como novas espécies tiveram cepas representativas depositadas em outras duas coleções: Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS), localizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil (<http://cbas.fiocruz.br/>) sob os números de acesso CBAS 711 (G62^T) e CBAS 710 (G98^T); e na Coleção de Microrganismos Aquáticos Importantes (CAIM), localizado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Nutrição (CLAD), Unidade de Mazatlan em Aquicultura e Gestão Ambiental, Sinaloa, México (<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>), sob os números de acesso CAIM1940 (G62^T) e CAIM1941 (G98^T).

Tabela 1 - Isolados de vibrios obtidos nos rodolitos coletados em diferentes pontos de profundidade da Buraca.

PROFUNDIDADE	ISOLADOS	TOTAL
27 m	G1 - G2 - G3 - G4 - G5 - G21 - G22 - G23 - G24 - G25 - G26 - G34 - G35 - G36 - G50 - G51 - G52 - G53 - G54 - G55 - G56 - G57 - G58 - G59 - G60 - G61 - G62 - G63 - G64 - G65 - G66 - G67 - G68 - G69	34
43 m	G6 - G7 - G8 - G9 - G10 - G11 - G12 - G13 - G14 - G15 - G16 - G17 - G18 - G19 - G20 - G27 - G28 - G29 - G30 - G31 - G32 - G33 - G37 - G38 - G39 - G40 - G41 - G42 - G43 - G44 - G45 - G46 - G47 - G48 - G49 - G70 - G71 - G72 - G73 - G74 - G75 - G76 - G77 - G78 - G79 - G80 - G81 - G82 - G83 - G84 - G85 - G86 - G87 - G88 - G89 - G90 - G91 - G92 - G93 - G94 - G95 - G96 - G97 - G98 - G99	65
		99

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Os DNAs das amostras foram extraídos pelo kit *NucleoSpin® Tissue*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Para ampliação dos genes *pyrH* e RNAr 16S foi realizada a técnica de PCR

(*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase), ao qual, cada produto de PCR continha volume final de 20 µl: 1 µl de cada iniciador *pyrH*: 80F (direto) de sequência 5'GATCGTATGGCTCAAGAAG3' e 530R (reverso) com sequência 5'TAGGCATTTTGTGGTCACG3' e RNAr 16S completo (Tabela 2), 12,5 µl de H₂O Milli-Q estéril, 4 µl de solução tampão PCR Green Buffer 5X (concentração final: 1X), 0,4 µl de dNTPs 10 mM (c.f.: 0,2 mM), 0,1 µl de GoTaq (1,25U final) e 1 µl de DNA extraído (Thompson *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2007).

Para o sequenciamento de cada fita do gene *pyrH*, 60 ng de DNA por reação foram utilizados, enquanto que, para o gene RNAr 16S foram utilizados 80 ng por reação. As reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços, com o kit *Terminator Big Dye* v.3.1 (Applied Biosystems). Cada reação consistiu de 6,3 µL de DNA, 1,2 µL de oligonucleotídeo (2,7 pmols/µL de concentração inicial), 1,5 µL de tampão e 1 µL do *Terminator Big Dye*. Todas as reações foram montadas a 4 °C, sob o abrigo da luz, uma vez que o *Terminator Big Dye* é fotossensível. O programa consistiu de 25 ciclos de 10s a 96 °C, 5s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após a reação, os produtos de PCR para sequenciamento foram precipitados nas placas, pela adição de 80 µL de isopropanol 75% gelado (-20 °C), incubando-se por 15 min à temperatura ambiente. Após este tempo, as placas foram centrifugadas a 3220 rcf, a 4 °C por 45 min. O sobrenadante foi então descartado por inversão e os poços foram secos por 5 min a 75 °C no termociclador. Após isto, 10 µL de formamida foram adicionados a cada poço, sendo os produtos de PCR (em cada poço) ressuspensos na formamida, pela incubação da placa por 5 min a 95 °C no termociclador. A formamida é uma substância que facilita a desnaturação das fitas duplas de DNA, agindo também como estabilizadora das fitas simples. Ao término desta incubação, a placa foi colocada em gelo para realizar um choque térmico, estabilizando assim a ressuspensão dos produtos em formamida. Após o choque térmico, a placa foi colocada imediatamente no sequenciador de capilares *Applied Biosystems* 3500.

Tabela 2 - Lista dos iniciadores (primers) utilizados para amplificar o gene RNAr 16S completo (1500 pb).

PRIMERS	REGIÃO DO RNAr 16S	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
26F	Primeiro terço direto	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	LANE, 1991 apud (BOURNE e MUNN, 2005)

519R	Primeiro terço reverso	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'	(THOMPSON <i>et al.</i> , 2001)
536F	Terço central direto	5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3'	(THOMPSON <i>et al.</i> , 2001)
926F	Terço final direto	5' AACTCAAAGGAATTGACGG 3'	(THOMPSON <i>et al.</i> , 2001)
1093R	Terço central reverso	5' GTTGCGCTCGTTGCGGGACT 3'	(THOMPSON <i>et al.</i> , 2001)
1492R	Terço final reverso	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'	LANE, 1991 apud (BOURNE e MUNN, 2005)

Fonte: Silva, 2012.

3.4. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Bibliotecas de DNA de cada amostra foram construídas usando o Kit de Preparação de Amostras de *DNA Nextera XT* (Illumina, San Diego, CA, USA). A distribuição de tamanho das bibliotecas foi avaliada usando o kit 2100 Bioanalyzer and High Sensitivity DNA (Agilent, Santa Clara, CA, USA). 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e a *KAPA Library Quantification Kit* (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) foram utilizados para a quantificação das bibliotecas. *Paired-end sequencing* (2 x 300 bp) foi realizado MiSeq (Illumina). As leituras obtidas foram tratadas usando o *prinseq-lite.pl* script (Schmieder and Edwards, 2011), onde leituras menores que 35 pb e sequências com contagem menor que Pherd 30 foram removidas. O controle de qualidade das sequências foi verificado usando FastQC tool v0.11.7 (Andrews, 2010). As leituras de sequência foram montadas usando o software A5-Miseq (Coil *et al.*, 2015). A predição gênica e anotação funcional foram realizadas utilizando o programa RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek *et al.* 2014). A integridade do genoma foi avaliada CheckM (Parks *et al.*, 2015).

3.5. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas dos genes *pyrH* e RNAr 16S foram realizadas usando trezes espécies de vibrios. Maioria das sequencias foram retiradas no banco de dado do NCBI. As sequencias relacionadas aos isolados foram retiradas dos genomas através do programa de anotação RAST. As sequencias foram alinhadas através do MUSCLE v. 3.8 (Edgar, 2004), com parâmetros padrão, e Gblocks v. 0.91b (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007) foi usado para a curadoria do

alinhamento. Árvores filogenéticas foram construída no MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), usando o método de *Maximum Likelihood*, baseado no modelo Hasegawa-Kishino-Yano para as sequências de RNAr 16S, e baseado no modelo *General Time Reversible* (GTR) (Nei and Kumar, 2000) e a variação de taxa distribuída em gama entre *sites* para sequências de *pyrH*. Porcentagem de *bootstrap* foi obtida depois de 1,000 replicações. Duas cepas foram utilizadas como *outgroups* para ambas as árvores; *Enterovibrio corali* LMG22228^T e *Aliivibrio finisterresnsis* CECT7228 na árvore de RNAr 16S, e *Enterovibrio corali* CAIM912 e *Aliivibrio finisterresnsis* CMJ11.1 na árvore de *pyrH*. Sequências utilizadas em ambas as árvores foram retiradas no banco do NCBI.

Para estabelecer a posição filogenômica das novas estirpes, construiu-se uma árvore filogenética (*MultiLocus Sequence Analysis*, MLSA) baseando-se nas sequências concatenadas de oito genes *housekeeping* (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, and *topA*). Foram utilizadas vinte e quatro espécies do gênero *Vibrio* e um *outgroup* (*Enterovibrio corali*). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE v. 3.8 (Edgar, 2004), com parâmetros padrão e, após concatenação das sequências, MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) foi usado para construir uma árvore filogenética, baseada no modelo *General Time Reversible* (GTR) e a variação da taxa distribuída em gama entre *sites*. Porcentagem de *bootstrap* foi obtida depois de 1,000 replicações.

3.6. ANÁLISES DE TAXONOMIA GENÔMICA

As comparações genéticas realizadas entre G62^T e G98^T e as espécies mais próximas foram realizadas com os genomas disponíveis nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). As análises utilizadas nesse trabalho foram: *Average Nucleotide Identity* – Média de Identidade de Nucleotídeos (ANI) (Konstantinidis and Tiedje, 2005), *Average Amino Acid Identity* – Média de Identidade de Aminoácidos (AAI) (Konstantinidis Tiedje, 2005), *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e Hibridização de DNA-DNA *in silico* ou *Genome-to-Genome Distance* (GGD) versão 2.1 (<http://ggdc.dsmz.de/>) (Auch *et al.* 2010; Auch *et al.* 2010; Meier-Kolthoff *et al.* 2013), como descrita em trabalhos taxonômicos anteriores (Thompson *et al.* 2013; Thompson *et al.* 2015). Tendo delimitação genômica entre espécies de $\geq 95\%$ AAI/NA/MLSAI, e $\geq 70\%$ GGD.

3.7. ANÁLISES FENOTÍPICAS

3.7.1. *IN SILICO*

A análise fenotípica baseada em genomas foi realizada utilizando o programa de *vibriophenotyping*, segundo Amaral *et al.* (2014), onde genes associados a vias bioquímicas específicas (isto é, reação de Voges-Proskauer, produção de indol, arginina di-hidrolase, ornitina descarboxilase, utilização de mio-inositol, sacarose e L-leucina, e fermentação de D-manitol, D-sorbitol, L-arabinose, trealose, celobiose, D-manose e D-galactose) são identificados através do algoritmo BLASTP (Altschul *et al.* 1990), com base em estudos anteriores usando características bioquímicas para a classificação de vibrios. No qual, quando genes envolvidos em um fenótipo estão presentes no genoma analisado, o organismo é considerado positivo para este fenótipo.

3.7.2. *IN VITRO*

Teste de salinidade foi submetido para determinar a tolerância das bactérias a determinada concentração de salinidade. Para tal finalidade, foi utilizado diferentes níveis de concentração de NaCl (0,1 – 1,0 – 1,5 – 2,0) g/L em meio líquido de TSB (Caldo Soja Trypticaseína) e em meio líquido Marine (este tendo como base a concentração de NaCl encontrada no ambiente marinho). O crescimento bacteriano de cada concentração foi determinado medindo-se a turbidez (OD600) das culturas no momento inicial e após passarem 24h e 72h depois das bactérias terem sido cultivadas, através de um espectrofotômetro. O teste de motilidade foi conduzido em meio semissólido Marine Ágar, determinado por inoculação por picada em tubos. Ao qual resultados positivos mostrariam um crescimento difuso que se estende da linha de facada e resultados negativos não teria nenhum crescimento fora da linha traçada anteriormente. Para os testes de salinidade e motilidade, as amostras foram incubadas a 30 °C por 48 h. Já no teste de temperatura, as amostras foram colocadas para crescer em ambientes com diferentes variações de temperatura (6 °C a 40 °C), tendo como base temperaturas descritas na literatura sobre o gênero estudado.

3.8. BUSCA POR GENES E METABOLISMOS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Para a busca de genes e metabolismos com potencial biotecnológico nas amostras estudadas, os genomas dos isolados foram analisados através de ferramentas de bioinformática contidas em plataformas online.

O programa *Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell - antiSMASH* 3.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org#!/start>), interage e integra com um grande número de ferramentas que analisa metabólitos secundários *in silico* já publicados anteriormente, assim fornecendo uma rápida identificação, anotação e análise de todo o genoma da estirpe G62^T e G98^T em busca de *clusters* gênicos para biossíntese de metabólitos secundários em genomas bacterianos e fúngicos (Weber, *et al.* 2015).

O *SEED* (<http://pubseed.theseed.org/>) faz parte de uma das plataformas contida no servidor RAST. Foi criado em 2004 para fornecer anotações consistentes e precisas do genoma usando como base milhares de genomas e como uma plataforma para descobrir e desenvolver anotações *de novo*, onde nele há uma integração constantemente de dados genômicos atualizados com um banco de dados de genoma, *front-end web*, API (*Application Programming Interface* - Interface de Programação de Aplicativos) e *scripts* de servidor (Overbeek, 2014). O *SEED Viewer* 2.0 foi utilizado para explorar os genomas das estirpes G62^T e G98^T anotados na plataforma do RAST para realizar comparações e buscas de genes e metabolismos voltados a mecanismos moleculares principalmente relacionados a biomineralização do carbonato de cálcio (CaCO₃), já que ambas bactérias foram isoladas de rodolitos, que contém grande parte de sua estrutura composta por carbonato de cálcio. Para realizar essa investigação de *insights* genômicos, as buscas se basearam em diferentes mecanismos presentes de microrganismos denominados de MICP (*Microbiologically induced calcium carbonate precipitation*), tal como: redução de sulfatos (Bontognali *et al.*, 2014), fotossíntese (De Nooijer *et al.*, 2014), hidrólise de ureia (Jiang *et al.*, 2016; Demuynck *et al.*, 2010), oxidação anaeróbica de sulfureto (Warthmann *et al.*, 2000), formação de biofilme e substância polimérica extracelular (Bhaduri *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. DIVERSIDADE DE VIBRIOS ISOLADOS DE RODOLITOS

A coleção de vibrios totalizou em 99 isolados (G1 a G99), no qual duas bactérias dessa coleção (G62 e G98) após passarem por diferentes análises, tanto fenotípicas como genômicas, foram classificadas como novas espécies.

As análises do gene *pyrH* resultaram numa identificação de 82 isolados entre os 99 coletados. As cepas analisadas com base nas sequências de *pyrH* resultaram em: 7 espécies de vibrios que já tinham sido descritas posteriormente e mais 2 linhagens que após passarem por uma série de pesquisas, tanto geneticamente como fenotipicamente, foram classificadas e descritas como novas espécies de vibrio, *Vibrio maerlii* (G62^T) e *Vibrio rhodolitus* (G98^T). Todas as espécies apresentadas nesse trabalho pertencem ao Gênero *Vibrio*: Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Vibrionales e Família Vibrionaceae. As bactérias isoladas dos rodolitos apresentadas nesse trabalho são: *Vibrio harvey* (36), *Vibrio owensii* (27), *Vibrio chagasii* (8), *Vibrio tubiashii* (6), *Vibrio corallilyticus* (1), *Vibrio ponticus* (1), *Vibrio alfacensis* (1), *Vibrio maerlii* (G62^T) e *Vibrio rhodolitus* (G98^T) (Figura 6).

Figura 6. Diversidade dos isolados de vibrios associados a rodolitos. Árvore filogenética montada com base na sequência do gene *pyrH* de vibrios isolados de rodolitos comparadas a de linhagens tipos de vibrios. Filogenia construída pelo método Maximum Likelihood e distância evolucionária definida pelo modelo General Time Reversible, com distribuição gamma = 5. Posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção par a par). *Bootstrap* expressos em porcentagem após 1000 repetições, sendo apresentados apenas os valores acima de 60%. Barra de divergência estimada em 2%.

completo foi montado com um total de 62 *contigs*, com uma cobertura média de 94-*fold*. O genoma do *Vibrio rhodolitus* tem o tamanho de 4.559.723 pb com uma porcentagem de 45.2% de conteúdo G+C e comprimento de N50 de 161.850 pb. Sua anotação do genoma identificou 4.085 CDS, 143 sequencias de RNA, onde 108 são tRNAs e 24 são rRNAs (Tabela 3). Para ambos os genomas, identificamos a presença de 106 de 111 genes essenciais. O CheckM estimava a completude do genoma em 99,07% (1,81% de contaminação) para G62^T, e em 99,93% (0,58% de contaminação) para G98^T. Estes valores de genomas de alta qualidade foram verificados novamente usando a coleção *enveomics* (Rodriguez-R & Konstantinidis, 2016).

Tabela 3 - Características gerais dos genomas do *V. maerlii* G62^T e *V. rhodolitus* G98^T.

Genoma	Tamanho	%GC	N50	L50	Nº de Contigs	Nº de Subsistemas	Nº de Sequencias Codificantes	Nº de RNAs
G62 ^T	4,758,035	44.5	382658	4	49	523	4233	143
G98 ^T	4,559,723	45.2	161850	9	62	515	4085	143

4.3. ANALISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas baseadas nas sequências dos genes RNAr 16S e *pyrH* mostraram que ambas as linhagens G62^T e G98^T, isoladas de rodolitos, são relacionadas distantemente filogeneticamente. O G62^T compartilhou 99% de RNAr 16S e 89% - 88% das identidades *pyrH* com *V. tubiashii* ATCC 19109 e *V. atypicus* HHS02 respectivamente, (Figuras 7 e 8); enquanto que as espécies mais próximas de G98^T foram *V. ponticus* CECT 5869T, compartilhando identidades de 99% e 92% de 16S e *pyrH*, respectivamente (Figuras 7 e 8). As réplicas do *bootstrap* suportam fortemente as ramificações.

Figure 7. Árvore filogenética das sequências do gene RNAr 16S pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo Tajima-Nei, e 1.000 réplicas *bootstrap*. Valores de *bootstrap* são mostrados. *Enterovibrio corallii* LMG22228^T e *Aliivibrio finisterresnsis* CECT7228 foram utilizados como grupo externo.

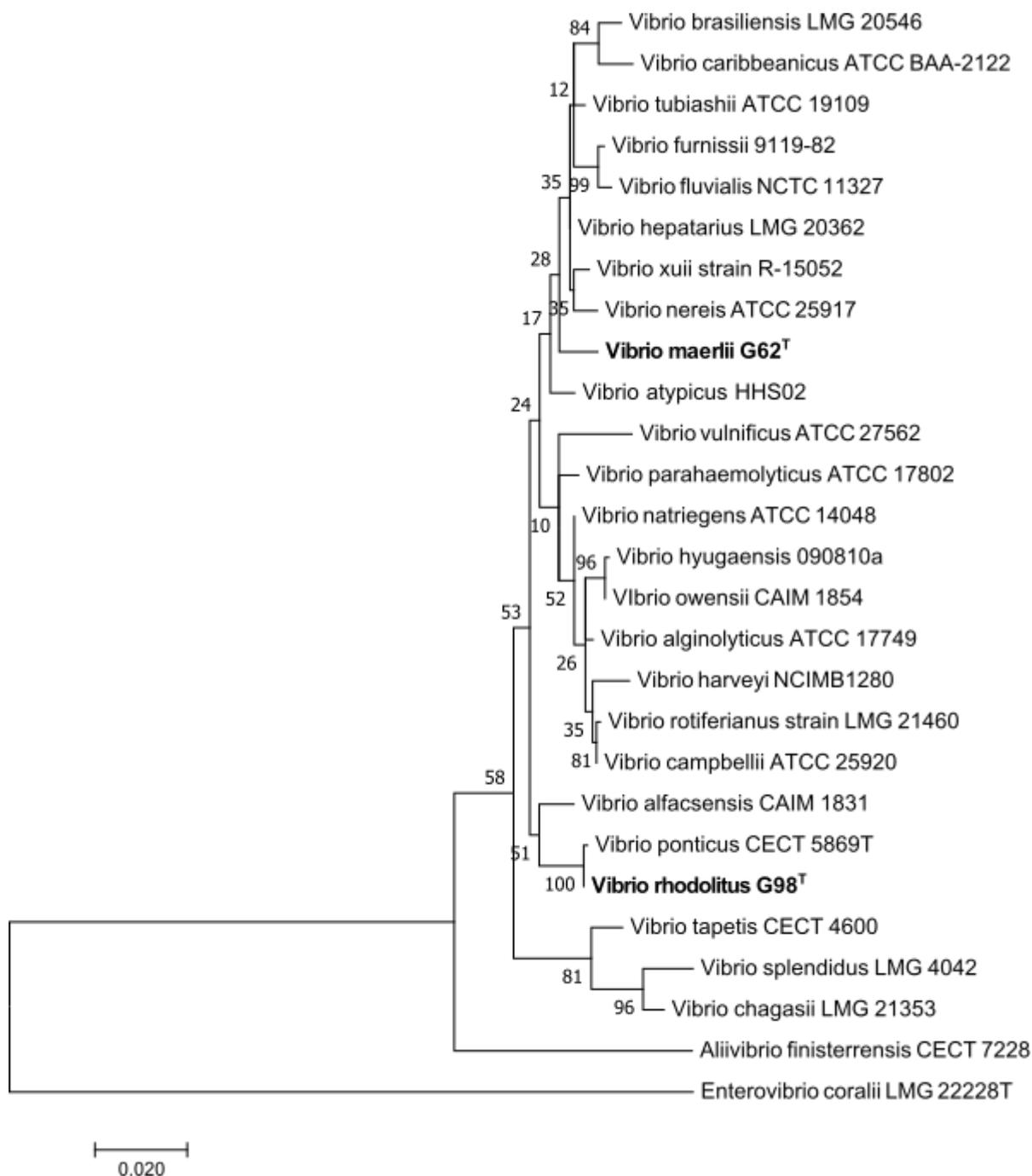
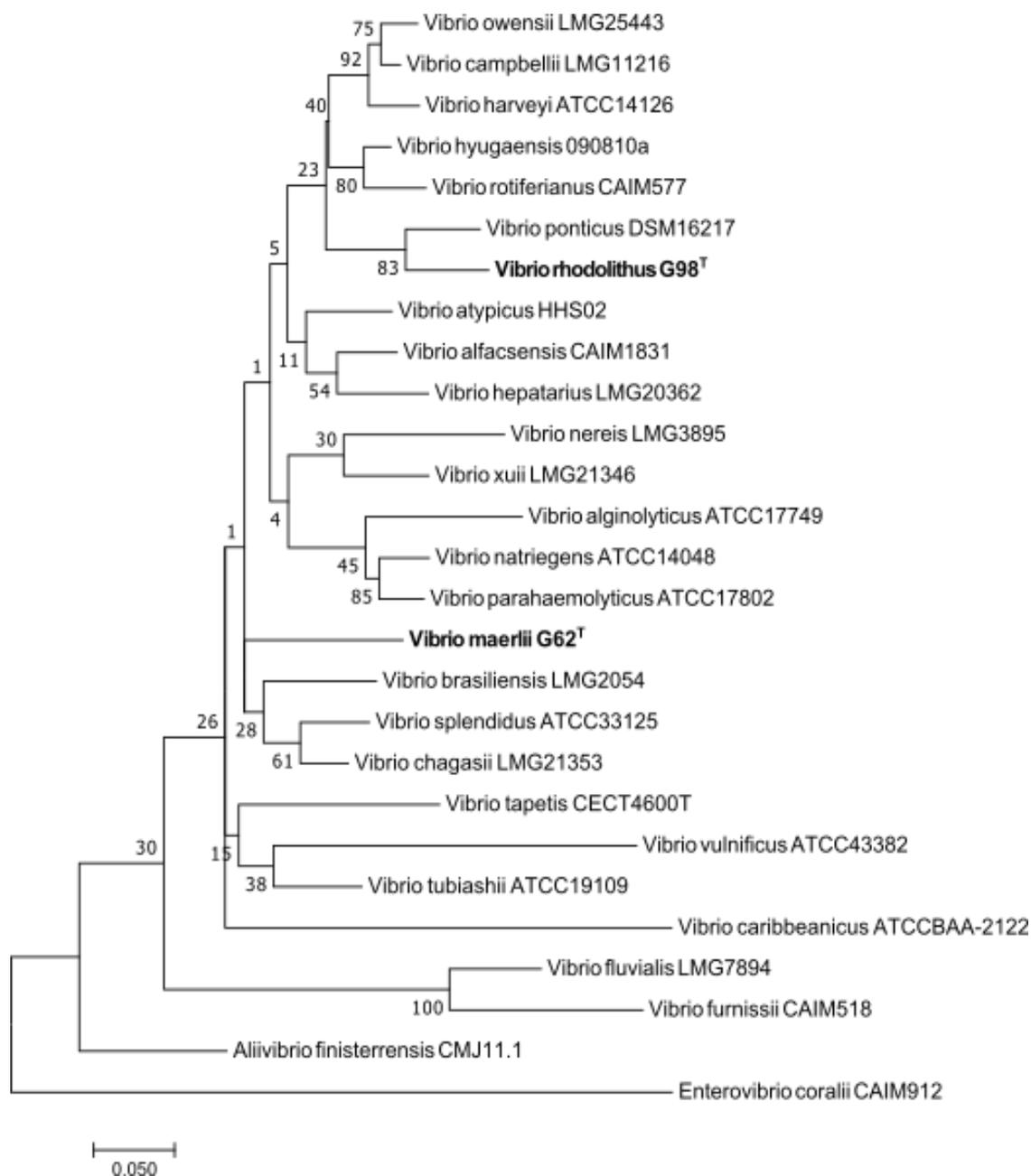


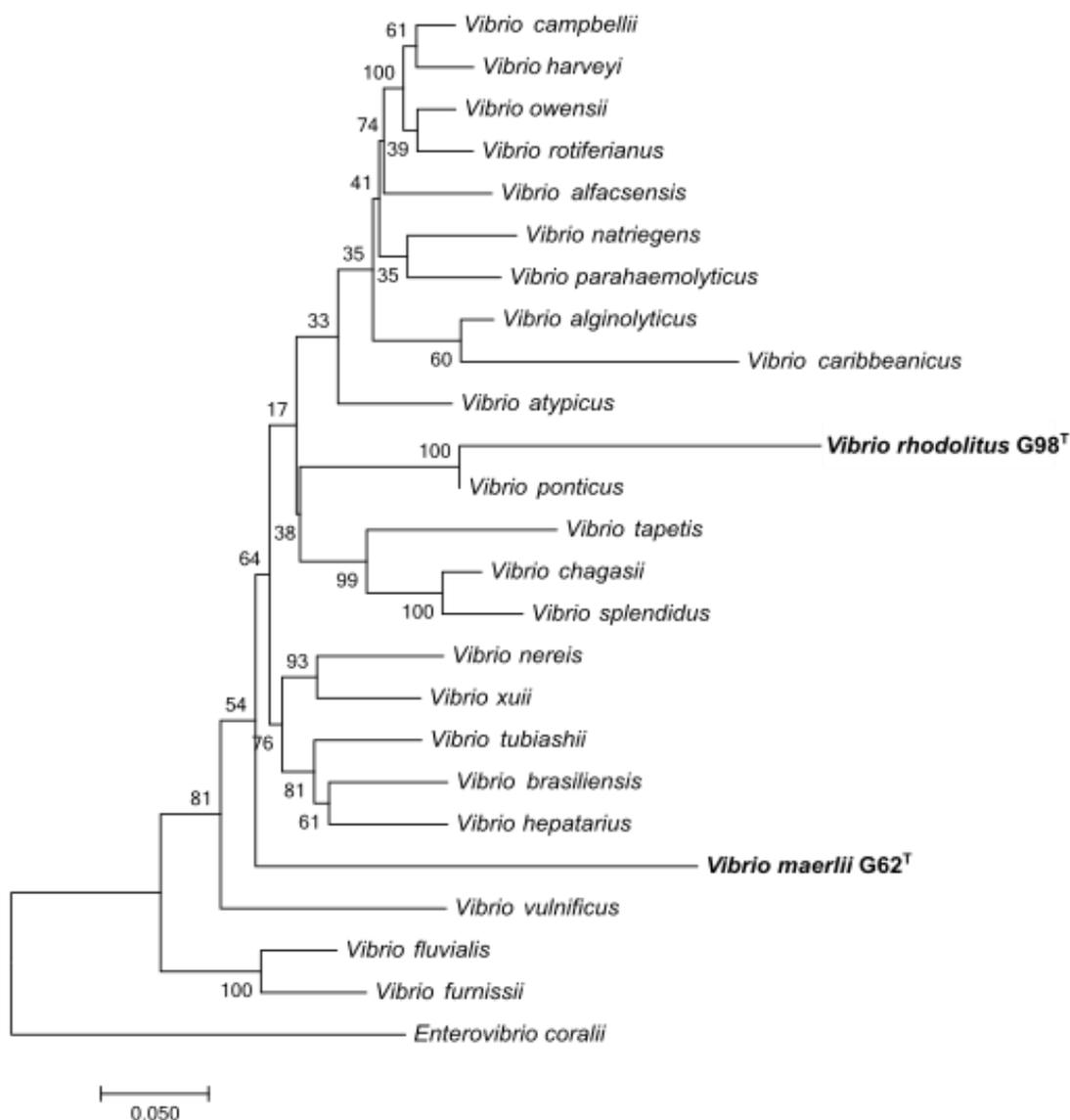
Figura 8. Árvore filogenética das sequências do gene *pyrH* pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de tempo geral reversível (GTR), e 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* são mostrados. *Enterovibrio coralii* CAIM912 e *Aliivibrio finisterrensis* CMJ11.1 foram utilizados como grupo externo.



A análise conjunta de alguns genes *housekeeping* (MLSA) foi utilizada para melhorar a compreensão da relação taxonômica das novas estirpes com as demais linhagens de vibrios mais próxima filogeneticamente, assim fornecendo uma visão mais ampla e confiável devido seu alto poder de resolução (Martens *et al.* 2008; Gevers *et al.* 2005). Nessa análise foi possível observar, como mostrado nas árvores anteriores (rRNA 16S e *pyrH*), que o isolado G62 formou um ramo isolado do seu grupo e o G98 agrupou com o *V. ponticus* (Figura 9).

Figura 9. Análise de Sequência Multilocus (MLSA) baseada em genes *housekeeping* concatenados (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *topA*), para 24 linhagens

de Vibrios. Árvore filogenética foi gerada usando o método de Máxima Verossimilhança, modelo *General Time Reversible* (GTR) e 1.000 réplicas de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* são mostrados. *Enterovibrio coralii* foi usado como grupo externo.



4.4. TAXONOMIA GENÔMICA

Os cortes padrões utilizados para as análises genômicas interespecies microbianas foram para AAI, ANI (ambos > 95%) e GGD (> 70%) (Tindall *et al.*, 2010; Rosselló-Móra e Amann, 2015; Thompson *et al.*, 2015). Usando essas métricas genômicas, foram encontradas semelhanças genômicas baixas entre G62^T e G98^T, ou seja, 71,88 / 80,74% AAI / ANI e 26,9% GGD (Tabela 3). Além disso, comparações feitas com os vizinhos filogeneticamente mais próximos para ambas as cepas G62^T e

G98^T também revelaram baixa identidade: menos de 90% dos valores de identidade AAI / ANI foram revelados pelo G62^T e seus vizinhos mais próximos, assim como pelo G98^T e seus vizinhos mais próximos; e para as análises de GGD, G62 e G98 apresentaram valores menores que 42% com seus parentes mais próximos (Tabela 4). Estes resultados apoiam a conclusão de que os isolados G62^T e G98^T são novas espécies representantes do gênero *Vibrio*, designados por *V. maerlii* G62^T sp. nov. e *V. rhodolitus* G98^T sp. nov.

Tabela 4 - Caracterização genômica do *Vibrio maerlii* G62^T sp. nov. e *Vibrio rhodolitus* G98^T sp. nov. Valores de (%) da identidade média de aminoácidos (AAI), identidade média de nucleotídeos (ANI), Hibridização de DNA – DNA (GGD) *in silico*, sequências do gene RNAr 16S e sequências do gene *pyrH* entre G62^T e G98^T e seus parentes mais próximos. Não há sequência do genoma disponível para *Vibrio atypicus* HHS02^T. na: (no apply).

<i>V. maerlii</i> G62^T					
Closest strain	ANI (%)	AAI (%)	GGD (%)	<i>pyrH</i> (%)	16S (%)
<i>V. atypicus</i> HHS02 ^T	na	na	na	89.0	99.0
<i>V. tubiashii</i> ATCC 19109 ^T	82.15	72.41	29.8	88.0	99.0
<i>V. hepatarius</i> LMG 20362	80.7	72.13	27.9	na	98.0
<i>V. antiquarius</i> EX25	81.07	72.26	27.8	na	98.0
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 ^T	81.01	72.07	28.1	88.0	na
<i>V. brasiliensis</i> LMG 20546	81.64	72.94	28.9	88.0	na
<i>V. splendidus</i> ATCC 33125 ^T	80.68	71.9	27.3	88.0	na
<i>V. xuii</i> LMG 21346 ^T	82.12	73.13	29.8	na	99.0
<i>V. rhodolitus</i> G98^T					
Closest strain	ANI (%)	AAI (%)	GGD (%)	<i>pyrH</i> (%)	16S (%)
<i>V. ponticus</i> CECT 5869 ^T	88.84	89.61	41.2	92.0	99.0
<i>V. furnissii</i> ATCC 19109 ^T	78.76	72.19	25.3	na	98.0
<i>V. hyugaensis</i> 090810 ^T	81.85	73.47	29.8	90.0	97.0
<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809 ^T	78.93	72.65	26.0	92.0	98.0
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	82.06	73.27	29.3	90.0	na
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 577 ^T	82.4	73.75	29.8	90.0	na
<i>V. natriegens</i> CCUG 16371	81.65	73.31	29.5	na	98.0
<i>V. maerlii</i> G62^T					
	ANI (%)	AAI (%)	GGD (%)	<i>pyrH</i> (%)	16S (%)
<i>V. rhodolitus</i> G98^T	80.74	71.88	26.9	86.7	97.7

4.5. DIAGNÓSTICO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS BASEADAS NO GENOMA

A informação fenotípica obtida diretamente a partir de sequências genômicas é uma alternativa à tradicional caracterização fenotípica que é demorada e restrita a um número limitado de características (Amaral *et al.*, 2014). Os genes que pertencem aos principais recursos bioquímicos de diagnóstico utilizados para identificar as espécies de vibrio (Amaral *et al.*, 2014) foram analisados para as cepas G62^T e G98^T e seus vizinhos filogenéticos mais próximos (Tabela 5). As características positivas reveladas no genoma do vibrio G98^T foram apresentadas no genoma do seu parente mais próximo de *V. ponticus* CAIM 1731.

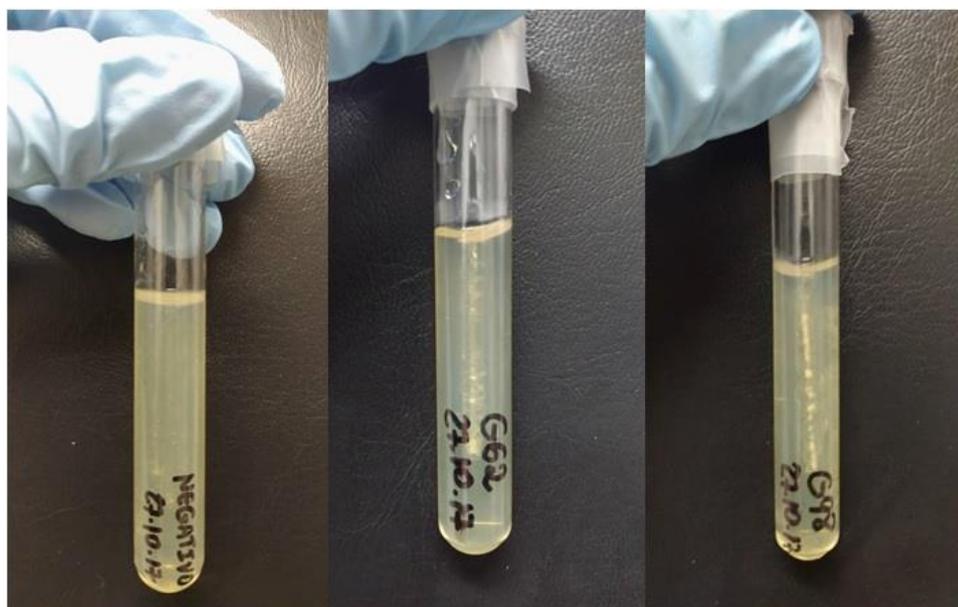
Tabela 5. Caracterização fenotípica *in silico* de *V. maerlii* G62^T sp. nov. e *V. rhodolitus* G98^T sp. nov. e outras espécies de Vibrio.

Propriedade	<i>Vibrio</i> <i>maerlii</i> G62 ^T	<i>Vibrio</i> <i>rhodolinus</i> G98 ^T	<i>Vibrio</i> <i>fluvialis</i> ATCC 33809 ^T	<i>Vibrio</i> <i>furnissii</i> NCTC 11218 ^T	<i>Vibrio</i> <i>parahemolyticus</i> RIMD 2210633	<i>Vibrio</i> <i>ponticus</i> CAIM 1731	<i>Vibrio</i> <i>scophthalmi</i> VS-12	<i>Vibrio</i> <i>tasmaniensis</i> LGP32	<i>Vibrio</i> <i>tubiashtii</i> ATCC 19109	<i>Vibrio</i> <i>xuui</i> DSM 17185
L-										
Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ornithine	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Vogues	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	+	+/-	+	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	+/-	-	-	+	+	-	-	+
D-Mannitol	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Arginine	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Trehalose	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+

4.6. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ANALISADAS *IN VITRO*

O teste de motilidade apresentou resultados positivos, onde na Figura 10 pode-se ver as estrias criadas por ambas as amostras demonstrando que houve locomoção no meio em comparação ao controle negativo. No teste de temperatura, as bactérias cresceram entre 12° a 30°C. Porém, havendo um maior desenvolvimento em temperaturas de 27° a 30°C, onde no período de 24h já demonstravam um crescimento significativo de sua colônia. No teste de salinidade a amostra G62^T mostrou crescimento entre concentração de 1,0 a 3,0 g/L de NaCl no meio. Já a amostra G98^T cresceu em todas as concentrações de NaCl testadas nesse trabalho. Entretanto, ambas tiveram melhor desenvolvimento nos meios de cultura com concentração de 2,0 a 3,0 g/L de NaCl.

Figura 10 – Teste de motilidade das estirpes G62^T e G98^T por inoculação por picada em tubos em meio semissólido Marine Ágar. Resultados são positivos por apresentar crescimento difuso que se estende da linha de facada em comparação a negativo onde não há crescimento fora da linha traçada anteriormente.



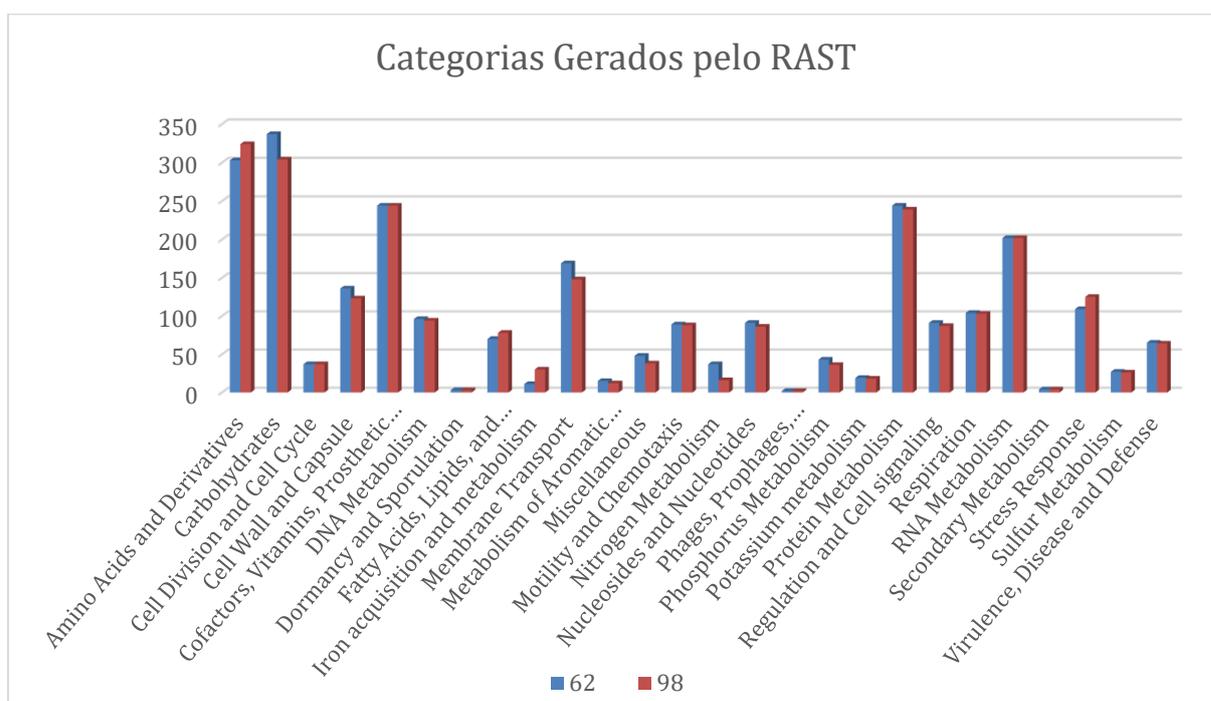
4.7. METABOLISMO SECUNDÁRIO E GENES DE INTERESSE

A análise *in silico* de metabolismo secundário na plataforma do antiSMASH, resultou no total de 22 e 17 genes clusters para G62^T e G98^T, respectivamente. Apesar de ter predito essa quantidade de clusters, o programa conseguiu distinguir, com

100% de veracidade, apenas 3 clusters presentes nas amostras, nas quais ambas deram positivas para bacteriocina e a amostra G98^T apresentou um cluster identificado para ectoína.

A partir da anotação dos genomas das estirpes G62^T e G98^T na plataforma RAST foram gerados subsistemas precisos de cada amostra (Figura 11), sendo possível a comparação e a busca de metabolismo e genes de interesse biotecnológico. Através das investigações realizadas nesses subsistemas, pôde-se notar a capacidades dessas cepas para resistência a antibióticos, formação de biofilme e a capacidade de comunicação por *quorum sensing*.

Figura 11 – Categorias dos Subsistemas encontradas nas amostras G62^T e G98^T produzidas a partir da anotação do RAST.

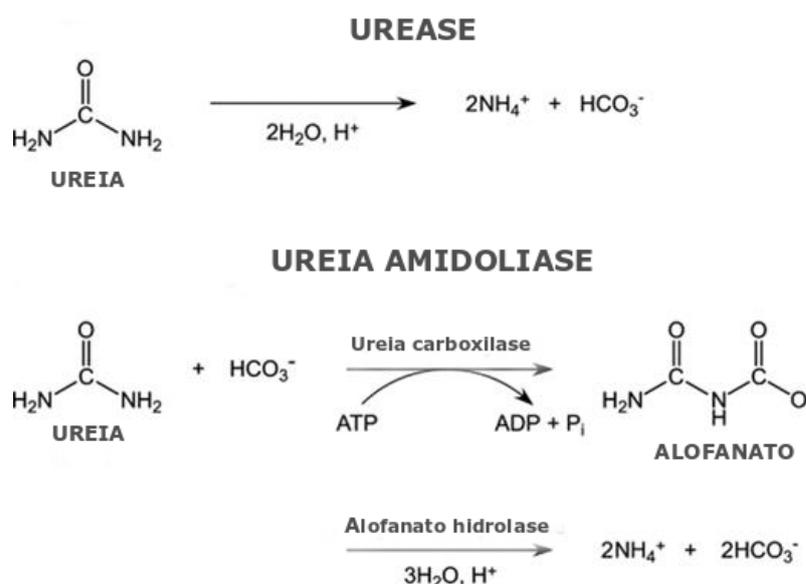


FONTE: SEED Viewer

Para ressaltar os metabolismo secundário apresentado pelo antiSMASH, o SEED Viewer também apresentou cluster de genes para a produção de bacteriocina para ambas as estirpes e de ectoína apenas para a G98^T. Neles também foi possível encontrar clusters de genes para a produção de auxina e biotina em ambos as estirpes.

Já para a busca dos clusters gênicos voltados à bioprecipitação de carbonato de cálcio nos subsistemas, a cepa G62^T apresentou genes responsável pela produção das enzimas ureia carboxilase e alofanato hidrolase que quando se associam formam outra enzima denominada ureia amidoliase, que assim como a urease, também é capaz de hidrolisar uréia. A uréia amidoliase decompõe a uréia em amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂) em um processo de duas etapas, enquanto a urease realiza esse processo em apenas um passo (Figura 12). A via de hidrólise da ureia é o método mais amplamente utilizado pelas MICP para o processo de biomineralização (De Muyenck *et al.*, 2010).

Figura 12 – Diferença das reações catalisadas pelas enzimas urease e uréia amidoliase. As duas reações catalisadas pela ureia carboxilase e alofanato hidrolase na reação amidoliase da uréia são mostradas individualmente. Já a enzima urease ocorre diretamente e não precisar de uma molécula de ATP para realizar sua reação.



FONTE: Adaptada de Kanamori *et al.*, 2005

Segundo o SEED Viewer, o subsistema relacionado a decomposição da ureia apresenta um total de 25 papéis funcionais, onde a amostra G62^T apresenta apenas 8 clusters ativos para esse função: UC – Ureia Carboxilase; AH - Alofanato Hidrolase; AMT - *Urea carboxylase-related aminomethyltransferase*; UCTsb - *Urea carboxylase-related ABC transporter (periplasmic substrate-binding protein)*; UCTp - *Urea carboxylase-related ABC transporter (permease protein)*; UCTa - *Urea carboxylase-related ABC transporter (ATPase protein)*; UreJ – *HupE (UreJ family metal*

transporter). Das oitos funções citadas, apenas duas (UC e AH) possuem informações sobre suas reações nesse processo. A sequência dos genes relacionados à decomposição da ureia presente na cepa G62^T encontra-se no Apêndice B.

Tabela 5 – Tipos de papéis funcionais encontrados no subsistema de decomposição de ureia presente na amostra G62^T e o código de anotação no RAST de cada cluster relacionado a essa função.

Papel Funcional	UC	AH	AMT		UCTsb	UCTp	UCTa	UreJ
Código de anotação no RAST de cada cluster	665	666	663	664	660	661	662	535

4.8. DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES DE VÍBRIOS

4.8.1. Descrição do *Vibrio maerlii* sp. nov.

Vibrio maerlii (ma.er'li.i. L. n. Maerlii, referindo-se à palavra bretã “maërl”, o outro nome dado para o rodolito). As células são Gram-negativas, aeróbicas e móveis. O crescimento ocorre a temperaturas entre 12 e 35 ° C e a concentrações de NaCl de 1,0 a 3,0%. O melhor crescimento bacteriano ocorre a 27-30 ° C na presença de 3,0% de NaCl. As colônias no ágar Marinho são de cor creme, circular e umbonato com margem inteira. *Vibrio maerlii* G62^T é a cepa tipo isolado de rodolito coletado na Buracas, em Banco dos Abrolhos, Brasil. O tamanho estimado do genoma é de 4,7 Mbp e tem um conteúdo de DNA G + C de 45,2%. O fenótipo *in silico* baseado no genoma sugere que a cepa tipo é positiva para sacarose, indol e D-manitol. E apresenta cluster de genes para produção de bacteriocina.

4.8.2. Descrição do *Vibrio rhodolitus* sp. nov.

Vibrio rhodolitus (rhodoliths do rhod.o.li'.tus. L. masc., referindo a fonte do isolamento, as estruturas do rodolito dominadas por algas coralinas de vida livre). As células são Gram-negativas, aeróbicas e móveis. O crescimento ocorre a temperaturas entre 12 e 35 ° C e a concentrações de NaCl de 1,0 a 3,0%. O melhor crescimento bacteriano ocorre a 27-30 ° C na presença de 3,0% de NaCl. As colônias em meio ágar Marinho são de cor creme, circular e umbonato com margem inteira. *Vibrio rhodolitus* G98^T é a cepa tipo isolada de rodolito coletado nas Buracas, em Banco dos Abrolhos, Brasil. O tamanho estimado do genoma é de 4,5 Mbp e tem um

conteúdo de DNA G + C de 44,5%. O fenótipo in silico baseado no genoma sugere que a cepa tipo é positiva para celobiose, indol e D-manose. E apresenta cluster de genes para produção de bacteriocina e actoina.

5. DISCUSSÃO

A coleção de bactérias apresentada nesse trabalho, isoladas dos rodolitos e coletados em uma das depressões denominadas Buracas, localizada em Abrolhos – BA, faz parte de umas das pesquisas pioneiras sobre os microrganismos presentes nessa estrutura e seu *habitat*. Este trabalho apresenta um ponto de vista genômico sobre a diversidade microbiana dessas estruturas de grande importância para o funcionamento do ecossistema marinho. No qual, o conhecimento sobre a biodiversidade presente nos ecossistemas é a base para o progresso biotecnológico almejado em diferentes áreas da ciência aplicada. De fato, a busca de organismos que possuem genes de interesse, tanto agronômico quanto industrial. Dependente das metodologias de classificação, uma vez que estirpes relacionadas dentro de um táxon têm maiores possibilidades de também possuírem essas características de interesse (Bull *et al.*, 1992). Desse modo, compreender melhor os microrganismos presentes nesse ecossistema, é de vital importância para entender como o próprio se comporta, funciona e se desenvolve. Assim, tentando fornecer informações sobre a diversidade microbiana dentro do rodolito holobionte em busca de seu potencial biotecnológico e suas interações ecológicas.

5.1. DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES DE VÍBRIOS

A comparação dos isolados a partir da similaridade do gene *pyrH* entre as demais sequências encontradas no banco de dados do NCBI, mostraram que as linhagens G62 e G98 apresentaram (>95%) de similaridade entre as espécies *Vibrio atypicus* HHS02 (G62 = 89%) e o *Vibrio ponticus* DSM 16217 (G98 = 92%), respectivamente, sendo estes valores abaixo do limite de corte que define uma representação de um microrganismo da mesma espécie (Thompson *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2009). A partir desses resultados, novas análises de via taxonômica foram aplicadas a esses isolados e comprovar que eram realmente novas espécies de bactérias.

Os sequenciamentos do RNAr 16S completo das cepas G62 e G98 foram realizados para determinar a posição filogenética do grupo em estudo por ser um marcador filogenético de amplo uso científico e para cumprir um dos parâmetros de

descrição de espécie, que prevê o sequenciamento completo desse gene (Stackebrandt *et al.*, 2002). Essa comparação resultou em altas taxas de similaridade, maior do que as estabelecidas (>98.5) entre as espécies tipos filogeneticamente mais próximas (*Vibrio atypicus* HHS02 e *Vibrio tubiashii* ATCC 19109: 99% de similaridade em relação a linhagem G62 e o *Vibrio ponticus* CECT 5869^T: 99% de similaridade em relação a linhagem G98). Isso resultou, porque a variabilidade no RNAr 16S é frequentemente baixa e pode não refletir a diversidade detectada por outras propriedades morfofisiológicas e genéticas em vários gêneros, incluindo o de *Vibrio* (Stackebrandt & Goebel, 1994). Portanto, as informações obtidas com a comparação do gene *pyrH* foram consideradas mais influentes por possuir uma maior resolução taxonômica do que o RNAr 16S dentro da classificação do gênero *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2007). Para obter uma resolução mais alta das relações filogenéticas dessas cepas dentro do gênero *Vibrio*, foi aplicado a análise do MLSA. O desenvolvimento dessa técnica, utilizando sequências gênicas conservadas, resulta em análises mais confiáveis sobre a diversidade de espécies entre as linhagens mais próximas filogeneticamente de forma rápida e eficiente, separando as estirpes em seus grupos distintos. G62^T apresenta num ramo isolado das outras linhagens presente na árvore, referindo-se que provavelmente não se agrupa em nenhum grupo presente na árvore e G98^T formou grupo com o *V. ponticus*, assim demonstrando pertencer ao seu mesmo clado *Scopthalmi*.

Apesar dos resultados obtidos pelas sequências do RNAr 16S completo, *pyrH*, e dos outros genes *housekeeping* indicarem que os isolados G62 e G98 diferiam de espécies já descritas anteriormente, apenas estas informações não seriam suficientes para confirmar se realmente esses isolados tratavam de novas espécies. Com base nessas informações, consideramos que seria de grande importância o sequenciamento completo do genoma dessas linhagens com o objetivo de extrair informações taxonômicas a partir do genoma para comprovar que essas espécies, de fato, eram novas.

A definição de espécies para procarioto é baseado na hibridização DNA-DNA (DDH). Ao permitir que o taxonomista, em princípio, obtenha uma estimativa da similaridade geral entre os genomas de duas linhagens. Segundo os parâmetros definidos pelos comitês de cientistas, um dos mais importantes critérios sobre definição de uma espécie, se refere ao fato de suas linhagens apresentarem mais de

70% de hibridização DNA-DNA entre si, para serem consideradas pertencente a mesma linhagem. Essa análise é considerada o padrão de ouro na taxonomia por ter sido capaz de apresentar como base o resultado de numerosos estudos com alto grau de correlação encontrado entre a similaridade do DNA e similaridade baseada em dados quimiotaxonômicos, sorológicos e de análise fenética numérica (Stackebrandt & Goebel, 1994; Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002). Desta forma, a informação obtida a partir da comparação entre genomas é sempre mais robusta e informativa do que aquela obtida pelo sequenciamento de um ou de alguns genes específicos. A evolução de um determinado gene pode não refletir a evolução de um genoma inteiro. A hibridização de DNA-DNA é uma técnica muito laboriosa e demorada na taxonomia de procariotos e requer equipamentos especiais e pessoal treinado, onde seus resultados obtidos não são acumulativos em bases de dados, sendo que cada experimento novo deve incluir as linhagens de referência, por isso são poucos laboratórios de referência no mundo que realizam essa técnica, assim se tornando um experimento cada vez mais inviável com a quantidade de organismos sequenciados nas últimas décadas (Thompson, 2006). Com os recentes progressos tecnológicos na área de sequenciamento dos genomas, as ferramentas de bioinformática foram cada vez mais se desenvolvendo para suprir a grande demanda das informações geradas. Em vista disso, uma análise *in silico* GGDC (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) foi desenvolvida para poder suprir a demandava de tempo e de equipamentos necessários para a técnica de hibridização de DNA-DNA (DDH) *in vitro*. Este serviço da *web* oferece métodos de última geração para inferir distâncias do genoma inteiro que são capazes de imitar DDH (oferecendo a mesma escala de valores). Com um uso tão mais fácil e prático: carregando apenas os arquivos de sequências que serão comparadas no formulário de cálculo de distância presente no *site* e esperar que o servidor calcule as distâncias intergenômicas entre as amostras submetidas, onde estes são convertidos em valores de similaridade análogos ao DDH e enviados para o e-mail cadastrado. Através dessa dinâmica foram calculados a distância genômica entre as estirpes G62^T e G98^T com as suas linhagens mais próximas (G62^T < 29.8% com *Vibrio tubiashii* ATCC 19109^T e *Vibrio xuii* LMG 21346^T; G98^T < 41.2% com *Vibrio ponticus* CECT 5869^T), demonstrando resultados satisfatórios para a hipótese das cepas serem espécies novas.

Outras análises, de grande importância na taxonomia genômica, também foram usadas para inferir na similaridade dos genomas entre as cepas G62 e G98 e

suas linhagens mais próximas, como o AAI e o ANI. O ANI foi utilizado por fornecer um meio confiável para discriminar populações estreitamente relacionadas, oferecendo uma maior resolução do que o gene 16S rRNA ou análise de sequência multilocus (Rodriguez-R & Konstantinidis, 2014). Enquanto o AAI que calcula as proteínas conservadas entre os genomas apresenta uma das análises de maior resolução taxonômica para discriminar espécies de vibrios (Thompson, 2009). G62^T apresentou maior identidade de ANI com *Vibrio tubiashii* ATCC 19109^T (82.15%) e maior similaridade de AAI com *Vibrio xuii* LMG 21346^T (73.13%), enquanto G98^T, tanto ANI como AAI, apresentou maior identidade com *Vibrio ponticus* CECT 5869^T (88.84% e 89.61%), respectivamente. Tipicamente, os valores de ANI e AAI, quando apresentam valores maiores de 95% de similaridade entre os genomas analisados, são classificados como da mesma espécie. Portanto, esses valores representaram mais um tipo de validação para a hipótese das espécies novas.

Para obter uma melhor compreensão da interação ecológica dessas novas cepas, análises voltadas para suas características fenotípicas foram investigadas. Uma dessas análises foi através da comparação do genomas das estirpes G62 e G98, no qual as características fenotípicas diagnosticadas analisadas, neste trabalho, foram um reflexo da informação do seu genoma, observando uma correlação clara entre a presença dos genes e os seus respectivos fenótipos (Amaral *et al.*, 2014). Utilizado características-chave de espécies tipos de vibrios mais próximas como base de diagnóstico fenotípicos dessas novas cepas descritas.

5.2. BUSCA POR GENES E ATIVIDADES METABÓLICAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As diferentes análises comparativas voltadas ao conhecimento dos genomas das cepas G62 e G98, mostraram que cada uma delas possuem características próprias e distintas.

Diferentes metabolismos podem se combinar para produzir a precipitação de minerais em ambientes naturais complexos. O papel principal das bactérias no processo de bioprecipitação tem sido associado à sua habilidade em criar ambientes alcalinos e incrementar a concentração e dissolução do carbono inorgânico por meio de várias atividades fisiológicas (Hammes, 2003).

Por serem bactérias isoladas de rodolitos, questionamos se essas novas espécies de vibrio (*V. maerlii* e *V. rhodolithus*) apresentavam algum metabólito que auxiliava na bioprecipitação do carbonato de cálcio (CaCO₃) presente na estrutura dos

rodolitos. Já que estudos comprovam que grande parte da biomineralização presente nesse processo ocorre por auxílio de microrganismos, assim induzindo que a gênese e o crescimento dos rodolitos podem estar intimamente relacionada a sua microbiota associada (Cavalcanti, 2015). O estudo desses microrganismos podem abrir caminhos tanto para um melhor entendimento sobre a relação das bactérias com os rodolitos, como para avaliar, o potencial dessas bactérias na indução de precipitação de carbonato de cálcio e seu grande interesse biotecnológico, já que esses microrganismos são altamente promissores para as novas tecnologias atuais e convencionais de biorremediação capazes de resolverem grandes problemas ambientais, como: descontaminação de metais tóxicos e radionuclídeos, sequestro do dióxido de carbono atmosférico e melhoria de materiais de construções (Reis *et al.*, 2017).

Através dos subsistemas criados a partir da anotação do genoma das novas espécies de *Vibrio maerlii* G62 e *Vibrio rhodolitus* G98 na plataforma do RAST, comparamos características presentes em microrganismos já descritos na literatura como indutores de precipitação de carbonato de cálcio (fotossíntese; redução de sulfato; degradação da ureia) com as amostras citadas.

Em busca de metabolismos voltados à degradação da ureia o *Vibrio maerlii* G62^T apresentou enzimas participantes na hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, um dos principais processos e mais estudados da biomineralização. Devido a clusters relacionados à produção das enzimas ureia carboxilase, alofanato hidrolase e diferentes tipos de transportadores de ureia. A ureia carboxilase, um membro das carboxilases biotin-dependente, catalisa a carboxilação de uréia dependente de ATP a alofanato. O alofanato é subsequentemente hidrolisado em amônia e dióxido de carbono pela função da alofanato hidrolase. Exibem uma associação evolutiva e funcional próxima. Eles catalisam reações consecutivas na via de degradação da uréia, assim formando outra enzima denominada de ureia amidaliase. (Sumrada & Cooper, 1982; Nishiya & Imanaka, 1993; Genbauffe & Cooper, 1991; Lin *et al.*, 2016; Whitney & Cooper, 1973).

Apesar de haver diversos trabalhos voltados para o processo de biomineralização através da enzima uréase, outra enzima capaz de degradar ureia independente de uma molécula de ATP, não existe nenhum trabalho especificamente voltado para a enzima ureia amidoliase. Isso sendo acarretado pela falta de

conhecimento voltado para a estrutura e funcionamento dessa enzima (Reis *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2016).

Além de trabalhar com a ureia carboxilase para a formação da enzima ureia amidoliase, o alofanato hidrolase também apresenta uma função importante em uma via de degradação do herbicida s-triazina. Nessa via, os compostos de s-triazina são degradados em última análise a alofanato, que é convertido em amônio e dióxido de carbono por alofanato hidrolase (Shapir *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2005; Shapir *et al.*, 2005; Shapir *et al.*, 2006). Em algumas espécies a enzima ureia amidoliase expressa patogenicidade: *Candida albicans* (causa infecções sistêmicas letais em pacientes imunocomprometidos); *Granulibacter bethesdensis* (facilita a sobrevivência em macrófagos e neutrófilos em pacientes com doença granulomatosa crônica) (Ghosh *et al.*, 2009; Navarathna *et al.*, 2012; Greenberg *et al.*, 2007);

Apesar de apresentar enzimas que são capazes de degradar ureia, não tem como afimar a partir dessas características que o *Vibrio maerlii* G62^T colabora com o processo de biomineralização de carbonato de cálcio presente nos rodolitos, pois além das enzimas apresentadas não terem suas funções e estruturas bem conhecidas; sabe-se que para que ocorra o processo químico da biomineralização os MICP precisam de quatro fatores principais: concentração de Ca²⁺; concentração de carbono inorgânico dissolvido; pH e a disponibilidade de sítios de nucleação (Hammes e Verstraete, 2002). Portanto, há necessidade de realizar mais análises voltadas para o teor químico dessa bactéria. Assim, essa pesquisa servindo como sinal para um possível potencial dessa espécie, pois qualquer progresso biotecnológico inicia-se a partir da procura e da descoberta de algum fenômeno biológico que possa ser explorado. Portanto, um planejamento eficiente e uma otimização dos programas de pesquisa visando à busca e à descoberta desses potenciais biotecnológicos são tão cruciais quanto qualquer outra etapa nesse processo (BULL *et al.*, 1992).

6. CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho apresentou um dos primeiros estudos voltados para a diversidade e comparação genômica de bactérias (vibrios) associadas a rodólitos, encontrados em uma das estruturas no assoalho marinho do Banco de Abrolhos, denominada de “Buracas”.

Estabelecemos uma coleção de isolados de vibrios. Nos quais, a partir de análises baseadas em taxonomia genômica duas bactérias presentes nessa coleção foram descritas como espécies novas de vibrios (*Vibrio maerlii* G62^T e *Vibrio rodolithus* G98^T). Demonstrando que a combinação de diversas análises genômicas pode ser usada para identificar bactérias em nível de espécie, contribuindo para o progresso dessa abordagem na taxonomia microbiana.

Mostramos que é possível estabelecer a caracterização fenotípica de vibrios associados a rodólitos através da análise de genomas, sendo uma forma mais rápida e acessível de fazer a caracterização fenotípica.

Vibrios associados a rodólitos podem ter um papel importante no processo de biomineralização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO-FILHO, G. M., & PEREIRA-FILHO, G. H. (2012). Rhodolith beds in Brazil: a new potential habitat for marine bioprospection. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(4), 782–788.

AMADO FILHO, G. M.; MANEVELDT, G.; MARINS, B. V.; MANSO, R. C. C.; PACHECO, M. R.; GUIMARÃES, S. P. B. Structure of rhodolith beds from 4 to 55 meters deep along the southern coast of Espírito Santo State, Brazil. *Cienc. Mar.*, v. 33, n. 4, p. 399-410, 2007.

AMARAL GRS, DIAS GM, WELLINGTON-OGURI M, CHIMETTO L, CAMPEÃO ME, THOMPSON FL AND THOMPSON CC (2014) Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:357-365 doi: 10.1099/ij.s.0.057927-0.

AMARAL GRS, CAMPEAO ME, SWINGS J, THOMPSON FL AND THOMPSON CC (2015) Finding diagnostic phenotypic features of Photobacterium in the genome sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1351-1358 doi: 10.1007/s10482-015-0414-6.

AZIZ, R. K., *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology, *BMC Genomics*, 2008, vol. 9 pg. 75

BAHIA RG, ABRANTES DP, BRASILEIRO PS, PEREIRA GH, AMADO GM. (2010). Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia state, Brazil. *Braz J Oceanogr* 58: 323–337.

BAROTT, K. L., & ROHWER, F. L. (2012). Unseen players shape benthic competition on coral reefs. *Trends in Microbiology*, 20(12), 621–8. doi:10.1016/j.tim.2012.08.004

BASTOS, A. C., MOURA, R. L., AMADO-FILHO, G. M., D'AGOSTINI, D. P., SECCHIN, N. A., FRANCINI-FILHO, R. B., THOMPSON, F. L. (2013). Buracas: Novel and unusual sinkhole-like features in the Abrolhos Bank. *Continental Shelf Research*, 1–8. doi:10.1016/j.csr.2013.04.035

BJORNDAL, K. A.; BOWEN, B. W.; CHALOUPKA, M.; CROWDER, L. B.; HEPPELL, S. S.; JONES, C. M.; LUTCAVAGE, M. E.; POLICANSKY, D.; SOLOW, A. R.; WITHERINGTON, B. E. (2011). Better Science Needed for Restoration in the Gulf of Mexico. *SCIENCE VOL 331 4 FEBRUARY 2011*.

BIRKETT, D. A.; MAGGS, C.; DRING, M. J. “Maerl”: An overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs. Scottish Association of Marine Science, UK Marine Special Areas of Conservation Project, 1999, 90 p.

BONTOGNALI, T. R. R.; MCKENZIE, J. A.; WARTHMAN, R. J. Microbially influenced formation of Mg-calcite and Ca-dolomite in the presence of exopolymeric substances produced by sulphate-reducing bacteria. *Terra Nova*, v. 26, n. 1, p. 72-77, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/ter.12072>>. doi: 10.1111/ter.12072

BOTTÉCCHIA, A. L.; SALAROLI, E.; OLIVEIRA, J. C. S. Diagnóstico Sócio-Econômico do Complexo dos Abrolhos. Projeto Abrolhos 2000. Diagnóstico Ambiental, Sócio-Econômico e Institucional. Conservação Internacional, Caravelas, Bahia: CI Brasil / Ibama 1997.

BRUCE, T.; MEIRELLES, M. P.; GARCIA, G.; PARANHOS, R.; REZENDE, E. C.; DE MOURA, L. R.; FRANCINI-FILHO, R. B.; CONI, C. O. E.; VASCONCELOS, T. A.; AMADO-FILHO, G.; HATAY, M.; SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R.; DINSDALE, E.; THOMPSON, L. F. (2012). Abrolhos Bank Reef Health Evaluated by Means of Water Quality, Microbial Diversity, Benthic Cover, and Fish Biomass Data *PLoS one* 7, 6

BRYANT, D., BURKE, L., MCMANUS, J., AND SPALDING, M. (1998). Reefs at Risk: A Map-based Indicator of Potential Threats to the World's Coral Reef. World Resources Institute, Washington, DC.

CAVALCANTI, G. S. Diversidade microbiana associada ao megahabitat bentônico banco de rodolitos de abrolhos (BA): holobiontes rodolitos e estruturas recifais buracas. 2015. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CAVALCANTI, GS; GREGORACCI, GB; MOURA RL, AMADO-FILHO GM, BASTOS AC, FRANCINI-FILHO R, PARANHOS R, FERREIRA CM, GHISOLFI RD, KRUGER R, GUTH AZ, SUMIDA PYG, BRUCE T, MAIA-NETO O, SANTOS EO, IIDA T, THOMPSON FL. 2013a. Sinkhole-like structures as bioproductivity hotspots in the Abrolhos Bank. *Continental Shelf Research* 70:126–134.

CAVALCANTI GS, GREGORACCI GB, DOS SANTOS EO, SILVEIRA CB, MEIRELLES PM, LONGO L, GOTOH K, NAKAMURA S, IIDA T, SAWABE T, REZENDE CE, FRANCINI-FILHO RB, MOURA RL, AMADO-FILHO GM, THOMPSON FL. 2013b. Physiologic and metagenomic attributes of the rhodoliths forming the largest CaCO₃ bed in the South Atlantic Ocean. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 8(1):52–62.

CHENG G., SHAPIR N., SADOWSKY M. J., WACKETT L. P. (2005) Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4437–4445.

COSTA, P. A. S.; DA COSTA BRAGA, A.; DA ROCHA, L. O. F. Reef fisheries in Porto Seguro, eastern Brazilian coast. *Fisheries Research*, v. 60, n. 2-3, p. 577-583, 2003. ISSN 0165-7836.

COVERT, M. W., E. M. KNIGHT, J. L. REED, M. J. HERRGARD, AND B. O. PALSSON. 2004. Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks. *Nature* 429:92–96.

DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 118-136, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.02.006>>. doi: 10.1016/j.ecoleng.2009.02.006

DE MUYNCK, W.; DEBROUWER, D.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and concrete Research*, v. 38, n. 7, p. 1005-1014, 2008. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cemconres.2008.03.005>>. doi: 10.1016/j.cemconres.2008.03.005

DE NOOIJER, L. J.; SPERO, H. J.; EREZ, J.; REICHAERT, G. J. Biomineralization in perforate foraminifera. *Earth-Science Reviews*, v. 135, p. 48-58, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earscirev.2014.03.013>>. doi: 10.1016/j.earscirev.2014.03.013

FIGUEIREDO, M. A.O.; SANTOS DE MENEZES, K.; COSTA-PAIVA, E. M.; PAIVA, P. C.; VENTURA, C.R.R. Experimental evaluation of rhodoliths as living substrata for infauna at the Abrolhos Bank, Brazil. *Cienc. Mar.*, v. 33, p. 427–440, 2007.

FRANCINI-FILHO, RONALDO B. *ET AL.* Live coral predation by parrotfishes (Perciformes: Scaridae) in the Abrolhos Bank, eastern Brazil, with comments on the classification of species into functional groups. *Neotrop. ichthyol. Porto Alegre*, v. 6, n. 2, p. 191-200, 2008.

FRANCINI FILHO, RONALDO B. *ET AL.* Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. *PLoS One*, v.8, n.1, p.1-12. 2013

FOSTER, M. S. Rhodoliths: between rocks and soft places - Minireview. *J. Phycol.*, v. 37, p. 659-667, 2001.

FOSTER, M. S.; RIOSMENA-RODRÍGUEZ, R.; STELLER, D.; WOELKERLING, W. M. J. Living rhodolith beds in the Gulf of California and their significance for paleoenvironmental interpretation. In: JOHNSON M.; Ledesma related facies flanking the Gulf of California, Baja -Vázquez J. (Ed.). *Pliocene Carbonates and California, Mexico. Spec. Pap. Geol. Soc. Am., Boulder*, p. 127–139, 1997.

GARCIA, ELOI S.; CHAMAS, CLAUDIA INÊS. Genética molecular: avanços e problemas. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.12, n.1, p.103 - 107, Mar. 1996. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X1996000100022&lng=en&nrm=iso>. Access on 21 nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1996000100022>.

GENBAUFFE, F.S. AND COOPER, T.G. (1991) The urea amidolyase (DUR1, 2) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Seq.* 2, 19–32.

GHERARDI, D. F. M. Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, southern Brazil. *Braz. J. Oceanogr.*, v. 52, p. 207–224, 2004.

GHOSH S, NAVARATHNA DH, ROBERTS DD, COOPER JT, ATKIN AL, PETRO TM, NICKERSON KW (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun* 77:1596–1605.

GODFRAY, C. Genomics and taxonomy for all. *Nature*. Vol. 417, número 6889, página 573, 2002.

GREENBERG DE, PORCELLA SF, ZELAZNY AM, VIRTANEVA K, STURDEVANT DE, KUPKO JJ III, BARBIAN KD, BABAR A, DORWARD DW, HOLLAND SM (2007) Genome sequence analysis of the emerging human pathogenic acetic acid bacterium *Granulibacter bethesdensis*. *J Bacteriol* 189:8727–8736.

HAMMES F, BOON N, VILLIERS J, VERSTRAETE W, SICILIANO D. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:4901–9.

HILTON-TAYLOR, C. 2000 IUCN red list of threatened species. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2000. ISBN 2831705649.

HOFLING, JOSÉ F. *et al.* New Strategies on Molecular Biology Applied to Microbial Systematics. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 39, n. 6, p. 345-352, nov. 1997.

IBP – Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis. Agenda prioritária da indústria de petróleo, gás e biocombustíveis 2014-2015. Rio de Janeiro: IBP. Disponível em <http://www.ibp.org.br/publicacoes/> Acesso 19 julho 2018.

HORTA P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea*, v. 28, n. 3, p. 243–265, 2001.

JACKSON, J.B.C., KIRBY, M.X., BERGER, W.H., BJORNDAL, K.A., BOTSFORD, L.W., BOURQUE, B.J., BRADBURY, R.H., COOKE, R., ERLANDSON, J., ESTES, J.A., HUGHES, T.P., KIDWELL, S., LANGE, C.B., LENIHAN, H.S., PANDOLFI, J.M., PETERSON, C.H., STENECK, R.S., TEGNER, M.J., WARNER, R.R., 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293, 629–638.

JIANG, N.J.; YOSHIOKA, H.; YAMAMOTO, K.; SOGA, K. Ureolytic activities of a urease-producing bacterium and purified urease enzyme in the anoxic condition: Implication for subseafloor sand production control by microbially induced carbonate precipitation (MICP). *Ecological Engineering*, v. 90, p. 96-104, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.073>>. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.01.073

JONES, C.G.; LAWTON, J.H.; SHACHAK, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69: 373–386.

JONES, G.P., SYMS, C., 1998. Disturbance, habitat structure and the ecology of fishes on coral reefs. *Austral Ecol.* 23 (3), 287–297.

KANAMORI, TAKESHI; KANOU, NORIHISA; KUSAKABE, SHINGO; ATOMI, HARUYUKI; IMANAKA, TADAYUKI. Allophanate hydrolase of *Oleomonas sagaranensis* involved in an ATP-dependent degradation pathway specific to urea, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 245, Issue 1, 1 April 2005, Pages 61–65, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.023>

KEMPF, M. Notes on the benthic bionomy of the N-NE Brazilian Shelf. *Mar. Biol.*, v. 5, n. 3, p. 213-224, 1970.

KEMPF, M.; COUTINHO, P. N.; MORAIS, J. O. Plataforma continental do norte e nordeste do Brasil. Nota preliminar sobre a natureza do fundo. *Trabhs Oceanogr.*, Univ. Fed. Pernambuco, n. 9/11, p. 95-110, 1967/9.

KNOPPERS, BASTIAAN; EKAU, WERNER; FIGUEIREDO, ALBERTO G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. *Geo-Marine Letters*, v.19, p.171-178. 1999.

KONAR, B.; RIOSMENA-RODRIGUEZ, R.; IKEN, K. Rhodolith bed: a newly discovered habitat in the North Pacific Ocean. *Bot. Mar.*, v. 49, p. 355–359, 2006.

KOSTYLEV, V.E., TODD, B.J., FADER, G.B.J., COURTNEY, R.C., CAMERON, G.D.M., PICKRILL, R.A., 2001. Benthic habitat mapping on the Scotian Shelf based on multibeam bathymetry, surficial geology and sea floor photographs. *Marine Ecology Progress Series* 219, 121–137.

LEÃO, Z.M.A.N. 1999. Abrolhos - O complexo recifal mais extenso do Oceano Atlântico Sul. In: Schobbenhaus,C.; Campos,D.A.; Queiroz,E.T.; Winge,M.; Berbert-Born,M. (Edit.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. Publicado na Internet em 22/11/1999 no endereço <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio090/sitio090.htm> [Atualmente <http://sigep.cprm.gov.br/sitio090/sitio090.htm>]

LEÃO, Z.M.A.N., GINSBURG, R.N., 1997. Living reefs surrounded by siliciclastics sediments: the Abrolhos coastal reefs, Bahia, Brazil. *Proceedings of the International Coral Reef Symposium* 8, 1767–1772.

LIN, Y., BOESE, C. J., & ST MAURICE, M. (2016). The urea carboxylase and allophanate hydrolase activities of urea amidolyase are functionally independent. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 25(10), 1812-24.

LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S.; HANISAK, M. D. Deepwater rhodolith distribution, productivity, and growth history at sites of formation and subsequent degradation. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, v. 150, p. 163–182, 1991.

LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S. Coralline algal rhodoliths form extensive benthic communities in the Gulf of Chiriqui, Pacific Panama. *Coral Reefs*, v. 27, p. 553, 2008.

LOREAU, M., NAEEM, S., INCHAUSTI, P., BENGTSSON, J., GRIME, J.P., HECTOR, A., HOOPER, D.U., HUSTON, M.A., RAFFAELLI, D.G., SCHIMD, B., TILMAN, D.,

WARDLE, D.A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294, 804–808.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., & STAHL, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.

MANFIO, G. P. 2003. Microbiota (Vol. 2). In: Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. Brasília, COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP, 111 p.

MILLIMAN J. D. Role of calcareous algae in Atlantic continental margin sedimentation. In: FLUGEL. E. (Ed.). *Fossil Algae*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 232– 247.

MILLIMAN, J. D.; AMARAL, C. A. B. Economic potential of Brazilian continental margin sediments. *An. Congr. Brasil. Geo.*, v. 28, p. 335-344, 1974.

MOBERG, F. & FOLKE, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*. 29. p: 215–233.

MOBERG, F. & RÖNNBÄCK, P.. (2003). Ecosystem services of the tropical seascape: interactions, substitutions and restoration. *Ocean & Coastal Management*. 46. p: 27–46.

MOURA, R. L.; LOPES, R. M. Abrolhos: fronteiras na pesquisa e conservação do mais importante banco coralíneo do Atlântico Sul. III CLAE e IX CEB. São Lourenço - MG, 2009. Disponível em: <http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_professores/rodrigo_leao.pdf>. Acesso em: 14/03/2012.

MYERS, N. (1997). Global biodiversity II: losses and threats. *Principles of Conservation Biology*, 2nd edition. Eds. Meffe, G. K.; Carroll, C. R. and contributors. p. 123-149.

NELSON, W. A. Calcified macroalgae – critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review. *Mar. Freshwat. Res.*, v. 60, p. 787–801, 2009.

NISHIYA, Y. AND IMANAKA, T. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the urea amidolyase gene from *Candida utilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 245–253.

NÓBREGA, M.S., Silva, B.S., Leomil, L. *et al.* *Antonie van Leeuwenhoek* (2018) 111: 1131. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1016-x>

NYSTRÖM M & FOLKE, C.. 2001. Spatial resilience of coral reefs. *Ecosystems* 4: 406–17.

OVERBEEK, R. *et al.* “The SEED and the Rapid Annotation of Microbial Genomes Using Subsystems Technology (RAST).” *Nucleic Acids Research* 42.Database issue (2014): D206–D214. *PMC*. Web. 8 Oct. 2018.

PAIVA, M. P.; FONTELES-FILHO, A. A. Produção e produtividade das pescarias de barcos linheiros na área de Abrolhos (Brasil). Sao Paulo (Brazil): Instituto de Pesca - Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária, 1997. 12p ISBN 0103-1767.

PRICE, N. D., J. L. REED, AND B. O. PALSSON. 2004. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:886–897.

REMAC. 1979. Geomorfologia da Margem Continental Brasileira e das Áreas Oceânicas Adjacentes. (relatório final). PETROBRÁS. CENPES. DINTEP. Rio de Janeiro. Brasil. p. 91-127.

RIUL, P.; LACOUTH, P.; PAGLIOSA, P. R.; CHRISTOFFERSEN, M. L.; HORTA, P. A. Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquat. Bot.*, v. 90, p. 315–320, 2009.

ROBERTS, C.M., ORMOND, R.F.G., 1987. Habitat complexity and coral reef fish diversity and abundance on Red Sea fringing reefs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 41, 1–8.

ROCHA, R. M.; METRI, M.; OMURO, J. Y. Spatial distribution and abundance of ascidians in a bank of coralline algae at Porto Norte, Arvoredo Island, Santa Catarina. *J. coast. Res.*, SI 39, p. 1676 – 1679, 2006.

RODRIGUEZ-R, L. M. & KONSTANTINIDIS, K. T. Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe* 9, 111–118 (2014).

SECCHIN, NELIO AUGUSTO. *Mapeamento De Habitats Marinhos No Banco Dos Abrolhos*. 2011.

SHAPIR N., CHENG G., SADOWSKY M. J., WACKETT L. P. (2006) Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2491–2495

SHAPIR N., MONGODIN E. F., SADOWSKY M. J., DAUGHERTY S. C., NELSON K. E., WACKETT L. P. (2007) Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *J. Bacteriol.* 189, 674–682

SHAPIR N., SADOWSKY M. J., WACKETT L. P. (2005) Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 187, 3731–3738

SILVEIRA, C.B. SILVA-LIMA A.W. FRANCINI-FILHO, R MARQUES, J.S.M. ALMEIDA, M.G. THOMPSON, C.C. REZENDE, C.E. PARANHOS, R MOURA, R.L. SALOMON, P.L. THOMPSON F.L (2015) Microbial and sponge loops modify fish production in phase-shifting coral reefs. *Environ Microbiol* 17(10), 3832–3846

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.

STENECK, R. S. The ecology of coralline algal crusts: convergent patterns and adaptive strategies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 17, p. 273-303, 1986.

SUMIDA, P. Y. G.; GÜTH, A. Z.; TRAVAGLIA, A.; MOURA, R. L.; DUTRA, G. F.; KLEIN, D.; BASTOS, A.; FRANCINI-FILHO, R. B.; BAHIA, R. G.; ABRANTES, D. P.; AMADO-FILHO, G. M. Desvendando o funcionamento do ecossistema do Banco dos Abrolhos. São Lourenço - MG, 2009. Disponível em: < http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_professores/paulo_sumida.pdf >. Acesso em: 14/03/2012.

SUMRADA, R.A. AND COOPER, T.G. (1982) Urea carboxylase and allophanate hydrolase are components of a multifunctional protein in yeast. *J. Biol. Chem.* 257, 9119–9127.

REDE ABROLHOS. Disponível em: <http://abrolhos.org/> . Acesso em: 14/10/2018.

STELLER D. L.; RIOSMENA-RODRÍGUEZ R.; FOSTER, M. S.; ROBERTS, C. Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: The importance of rhodolith structure and consequences of anthropogenic disturbances. *Aquat. Conserv. mar. Freshwat. Ecosyst.*, v. 13, p. 5–20, 2003.

TESTA, V. Calcareous algae and corals in the inner shelf of Rio Grande do Norte, NE, Brazil. *Internat. Coral Reef Symp.*, 8. v. 1, p. 737-742, 1997.

TESTA, V.; BOSENCE, D. W. Physical and biological controls on the formation of carbonate and siliciclastic bedforms on the north-east Brazilian shelf. *Sedimentol.*, v. 46, p. 279-301, 1999.

VERMA, S. C.; MIYASHIRO, T. (2013). Quorum sensing in the squid-Vibrio symbiosis. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16386-401. doi:10.3390/ijms140816386

VILLAS-BOAS, A. B.; RIOSMENA-RODRIGUEZ, R.; AMADO FILHO, G. M.; MANEVELDT, G.; FIGUEIREDO, M. A. O. Rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales; Rhodophyta) from Espírito Santo State, Brazil, including the description of *L. depressum* sp. nov. *Phycol.*, v. 48, n. 4, p. 237–248, 2009.

WARTHMAN, R.; LITH, Y. V.; VASCONCELOS, C.; MCKENZIE, J. A.; KARPOFF, A. M. Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology*, v. 28, n. 12, p. 1091-1094, 2000. Disponível em: <http://geology.gsapubs.org/content/28/12/1091.short> .doi:10.1130/0091-7613(2000)28

WILSON, S.; BLAKE, C.; BERGES, J. A.; MAGGS, C. A. Environmental tolerances of free-living coralline algae (Maerl): implications for European marine conservation. *Biol. Conserv.*, v. 120, p. 279–289, 2004.

WHITNEY, P.A. & COOPER, T. (1973) Urea carboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a minimal two-step reaction sequence. *J. Biol. Chem.* 248, 325–330.

ZHU, Y., MA, N., JIN, W., WU, S., & SUN, C. (2017). Genomic and Transcriptomic Insights into Calcium Carbonate Biomineralization by Marine Actinobacterium *Brevibacterium linens* BS258. *Frontiers in microbiology*, 8, 602. doi:10.3389/fmicb.2017.00602

APÊNDICE A – LISTA DE ESPÉCIES

Tabela detalhada com as espécies e linhagens bacterianas obtidas neste estudo. Profundidade onde foram coletados os rodolitos, meio de cultura, marcador filogenético utilizado para fazer a identificação estão discriminados para cada linhagem obtida. Coordenadas dos pontos: 43 m (S17.81330 W38.23744) e 27 m (S17.81399 W38.24306). Legenda: x na coluna “Identidade pyrH” representa dado não disponível.

ISOLADOS	PROFUNDIDADE	MEIO DE CULTIVO	IDENTIDADE <i>pyrH</i>
G1	27m	Marine	<i>V. owensii</i>
G2	27m	Marine	<i>V. harveyi</i>
G3	27m	Marine	<i>V. owensii</i>
G4	27m	Marine	<i>V. owensii</i>
G5	27m	Marine	<i>V. harveyi</i>
G6	43m	Marine	x
G7	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G8	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G9	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G10	43m	Marine	x
G11	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G12	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G13	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G14	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G15	43m	Marine	<i>V. chagasii</i>
G16	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G17	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G18	43m	Marine	x
G19	43m	Marine	<i>V. corallilyticus</i>
G20	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G21	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G22	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G23	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G24	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G25	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G26	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G27	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G28	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G29	43m	Marine	x

G30	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G31	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G32	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G33	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G34	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G35	27m	Marine	<i>V. owensii</i>
G36	27m	Marine	<i>V. harvey</i>
G37	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G38	43m	Marine	<i>V. owensii</i>
G39	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G40	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G41	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G42	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G43	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G44	43m	Marine	<i>V. tubiashii</i>
G45	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G46	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G47	43m	Marine	<i>V. tubiashii</i>
G48	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G49	43m	Marine	<i>V. harvey</i>
G50	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G51	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G52	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G53	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G54	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G55	27m	TCBS	<i>V. tubiashii</i>
G56	27m	TCBS	x
G57	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G58	27m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G59	27m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G60	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G61	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G62	27m	TCBS	<i>V. maerlii</i> G62^T
G63	27m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G64	27m	TCBS	x
G65	27m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G66	27m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G67	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G68	27m	TCBS	<i>V. owensii</i>

G69	27m	TCBS	<i>V. ponticus</i>
G70	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G71	43m	TCBS	x
G72	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G73	43m	TCBS	x
G74	43m	TCBS	<i>V. alfacsensis</i>
G75	43m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G76	43m	TCBS	x
G77	43m	TCBS	<i>V. chagasii</i>
G78	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G79	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G80	43m	TCBS	<i>V. tubiashii</i>
G81	43m	TCBS	x
G82	43m	TCBS	<i>V. harvey</i>
G83	43m	TCBS	<i>V. harvey</i>
G84	43m	TCBS	<i>V. harvey</i>
G85	43m	TCBS	<i>V. harvey</i>
G86	43m	TCBS	<i>V. harvey</i>
G87	43m	TCBS	x
G88	43m	TCBS	x
G89	43m	TCBS	x
G90	43m	TCBS	x
G91	43m	TCBS	<i>V. tubiashii</i>
G92	43m	TCBS	<i>V. tubiashii</i>
G93	43m	TCBS	x
G94	43m	TCBS	x
G95	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G96	43m	TCBS	x
G97	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>
G98	43m	TCBS	<i>V. rhodolitus</i> G98^T
G99	43m	TCBS	<i>V. owensii</i>

**APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DE GENES ENCONTRADOS NA CEPA VIBRIO
G62^T RELACIONADOS A DECOMPOSIÇÃO DE UREIA.**

>FIG|6666666.266907.PEG.535 HUPE-UREJ FAMILY METAL TRANSPORTER
[VIBRIO G62 SP.]

ATGTTTCATTTCTAATGATTTAATTAATAACAAGGTTTCGTTTTATGAAAAAGATAGGTGCT
CTGGCTCTTCTGATGTGCCCTACGTTAGCGTTTGCACATCCTGGTCATACCGAGGTTGGA
TTTATTTCTGGGTTTGTTCATCCATTCACAGGGATTGATCACTTAGCTGTCATGTTTGA
CTAGGTTTGGTGTGCAGCCTCTTTTTACGAAAGAAAGTGCAAACAAATGGCTAGTGTTA
GTAGCACTCACCGTTAGTTTAGGACTTGGTTCAGCGCTCGCCATTGCGGGATTCAAAGTG
CCGATGTTTGAAATGATGATCTCATTATCAGTTGTATTAGTGGGTGCGTTGACAATTTGT
GGTGGGTTAGGTCGTTTCGATTAACAAGTGGGTGGTTTGTGGATTGGCCATCATGACTGCA
TTTCACGGATATGTTTCATATTATTGAAGGCGCAACAGCAACGATTGCTAATTTTGGTCAC
TACACAATGGGTTTTATTCTTTCTAGTGTGGCCTTTATGTTGGCGGGCTAGCTCTGGGA
AGTAAGATTGCGCATGTTTCAATGAAGCCACAAGTATGTATCATTTCTGGTGGATTTTAT
GTGGCTTTAGCGTTAGTGCTAGGTTTGTGA

>FIG|6666666.266907.PEG.660 UREA CARBOXYLASE-RELATED ABC
TRANSPORTER, PERIPLASMIC SUBSTRATE-BINDING PROTEIN [VIBRIO G62
SP.]

ATGAAAGCTCAAATCAAGAAAAGCTTACTTGCATCAATTGTTGGCACCACACTACTCACT
TCTGCCTTTTTCCCCGCTTGCATTAGCTCAAGAAAAGAGAAATTCACACTTGCCTGGTCT
ATCTACGTTGGGTGGATGCCTTGGGATTATGCAGACCACTCTGGAATTCTAGACAAATGG
GCAGATAAGTACGGCATTGAGATTGATGTTGTACAGGTTAACGACTACATCGAGTCCATT
AACCAATTCACCACAGGCCAGTTCGATGCGACAGTAATGACCAATATGGACGCACTGACG
ATCCCAGCAGCAAGCGGCGTGGATTCTACCGCACTCGTGGTCGGTGACTTTTTCAAACGGT
AATGACGGTATTGTTCTCAAAGGCGACAAAGGGTTAGAAGACCTGAAAGGCCAGTTCGATT
AACCTTGTGCGAGCTGAGTGTCTCTCACTACCTGATGGCGCGCGCACTAGAAAGTGTGGGC
ATGAGTGAGCGTGATGTAAGAGTGGTTAACACGTCTGATGCCGACCTCGTGGCGGCATTT
AGCACCAGTGATGTGACTTCCGTTGTTACATGGAACCCACTATTAAGCGAAATCACTTCT
CAGCCAGACACTTCTTTTGTTTTCAACTCTTCCGATATTCTGGCGAAATCATCGACCTG
TTAGTTGTGAATACAGAGACATTAGAAAGTAATCCTGCGTTAGGTAAGGCATTGACGGGC
GCATGGTATGAAATCATGTGATCATGCAATCAGCAGAGCAGGGTGACGAAGCGAAGTCC
TACATGGCGCAAGCATCGGGTACCGATCTGGATGGCTACAAGTCACAGCTTCAAGCGACC
AACATGTTCTATGCCGCGGATGATGCAGTTAGCTTTACTCAAAGCCCTAAACTGGCAGCG
ACAATGCAGAAAGTCAGTGAGTTTTCGTTTTGAGCATGGCCTATTGGGTGAAGGCGCTCCT
GATGCGGGTTTCATCGGTGTAGAAACACCAACAGGCGTTTACGGTGACCCAAGTAACGTC
AAGCTCCGATTTACCTCTGAGTACATGCAGATGGCAGCGGATAACAAGCTGTAA

>FIG|6666666.266907.PEG.661 UREA CARBOXYLASE-RELATED ABC
TRANSPORTER, PERMEASE PROTEIN [VIBRIO G62 SP.]

ATGACCAAAGTAATTAACCGCCATCCGTCTAAAATGGGCAGAGTGATGCTCGGTGTGATG
CCATTTCTGATCCTGCTTGCCGTTTATGTGACGGCATCAGATGCCAGACTGGCAGCTAAC
TCTGCTGATAAGTTGCTTCCCGCATTTCAGCAGTTTTGCTGATGCTATCGAGAGAATGGCG
TTTACCCCAAGCCGCAGAACCGGTGAATACCTAATGTGGACAGACACCTTCGCCAGCCTA
GCAAGACTGGGCTGGGGAATTGGTATCAGTGCCTTGATTGGGTTATCACTCGGCATCGCG
ACAGGCATTATTCCATTAGTGCCTTCTTCAATTATCACCGGTCATTACAGCCGTTTCGTTG
ATTCCACCAATGGCGATTCTACCTATTTTGTTCATCTCTTTCGGCGTGGGAGAGCTCTCT

AAAGTAGTACTGATTGTGATAGGCGTGTGTCCGATCATCATTTCGAGACATTCAGCTGAGG
GTGCAGAGCCTACCGGATGAGCAGCTTATTAAGGCGCAAACACTGGGCGCAAACAGCTGG
CAGATCATTGTGCGTGTTCATCCTTCCGCAAATTATGCCAAAGCTGATTGAAGCGTTTCGC
CTTACGTTAGGTAGCGCATGGCTGTTCTTGATAGCAGCTGAGGCGATTGTTCGCCACAGAG
GGGCTGGGCTACCGCATCTTCTTAGTACGTCGCTACCTATCCATGGATGTGATTCTTCCA
TATGTATTGTGGATCACCATCTTGGCTTACAGCATGGATTGGTTACTGCGTTTAGCCTCG
AAAAAGCTAAGTCCTTGGTATCACCAGTCACAAGGAGAGAACAATGGTTAA

**>FIG|6666666.266907.PEG.662 UREA CARBOXYLASE-RELATED ABC
TRANSPORTER, ATPASE PROTEIN [VIBRIO G62 SP.]**

ATGGTTAATTTGCACACCACCAATGAAACCAAGCAGCCGATCATCCAAGTGAAGCAGGTG
TGAAAGAGTATGGCGACAACATCGTGCTTGAGCGTTTGAACCTGACCGTCAATGAAGGT
GATTTTGTGAGCATCGTTCGGTGCCTCAGGCTGCGGAAAAACCACCTTCTCAATATGCTA
TTAGGGACGGAAACACCCTCAAGAGGAGAAGTGTACTAGATGGAGAACCATTAACCCAA
GAGCCGGGTGTTGAACGAGGCATCGTGTTCCAGAAATATTCGTTTCCCCATCTGACG
GCTCTTGAGAATGTGATGCTCGGCTATGAGTTTGAGGAAAAAAGACTTCTAGCACCTTA
TTGGGTCGACTGTTTGGCGCTAAGAAGCAACAAGCTAAAGAGCAAGCACTCAAGATGCTT
GAGCAGTTTGGCCTGTTAGCGGCTCAAGATAAATACCCACATGAGTTATCCGGCGGTATG
AGACAGCGCCTCTCAATTGCTCAGGCGTTAATTAAGAAGCCAAGGATTTTACTACTCGAT
GAGCCGTTTGGCGCACTTGATCCGGGCATTCGCAAAGACATGCACGTGTTAGTGAAGTCC
CTTTGAAAGAGCAGAACCTAACGGTATTCATGATCACGCACGATCTCAGCGAAGGCTTC
CATTTAGGTAACCGGTTATGGGTGTTTGATCATACTCGTCACGACGAGCAGGCCCCGGAG
CGTTTTGGTGCAGGTGACGTTTGATATTCCAACCGAACAGTTGGAACACACTCAACCA
GAACAACCTTCTCAAAAAAATCGCATAA

**>FIG|6666666.266907.PEG.663 UREA CARBOXYLASE-RELATED
AMINOMETHYLTRANSFERASE (EC 2.1.2.10) [VIBRIO G62 SP.]**

ATGTCAGTAAACAGGAAGTGATATTTTCAGACACTCTACCTGGGGCCGCACACTGGTCT
ATGGTGGTGCCAAAAGGTGCAACGGTAAGGTTTAAAGACCTAGAAGGCGGCGCAAATCTC
AGTGTGTTGTTTTACAACCCAGCCAACCCATTGGAGCGATAACAACGCGCCAGATACCTTG
AAATGCCAACATACGTTCAAGCTTACAGAAGGCAATTGTTTGTACTCAGACATGGGGCGC
ATCTTCTGCTCGATTGTTTCGCGATGATACCGGTTGGATTGATACGGTGTGTGGCGTTGCC
AGTAAGCAAAAGGTGCGAGAAAAGTGGGGCGAGCGTGATTACCAAACCGAACGTAATCAG
TGAAACAAAACGGCTATGATGCACTGCTGGTTGAGGTGGCTAAATATGGTTTAGGTAAG
CGTGATTTGGCGGCGAACTTAAATCTGTTTCAAGTCTCGACCGATGAAGTGGGCAAC
CTGAGTTACGACCCACAGCATAGCAAAGCAGACGACTGTATTGAGCTGCGCTTTGAGATG
GATACGTTAGTGGTGATGACCACATGTCCGCATCCCCTTAACCCTGCAGAGACTTATCCA
TATCAACCTGTTGAGGTACGGTGTGTTGAATCAGATCCAATGCTTGAAAGCGACACTTGT
TTGAATCACCGCAAAGAGAACGCACGAGGTTTTGAGAACAATCGCCGTTATACATCGACG
ACCCAGCAAGGCTTCGATACTTCTTCCCACCACCATCATTGCTAA

**>FIG|6666666.266907.PEG.664 UREA CARBOXYLASE-RELATED
AMINOMETHYLTRANSFERASE (EC 2.1.2.10) [VIBRIO G62 SP.]**

ATGATCGTAGAAAGCCCATACAGCCAAGTGAAGCCCTGTATCGTGATGTCGTTCCAGCT
GGTGATTACTACATGAAAGTGCTCAAGAAAGGCGAGACGTTTTCGTATTCTCGATATCGAT
GGCAACCAAGCGGCAGATACATTGTTTTATAACGCTAATGACCCATCTGAGCGCTATAGC
GCCATCGATAACCATTCGTGAGCAGGGGAATGTTTACCTAACGGCAGGTACTAAGATCTTA
TCTGACCAAGGCAATGTGATGCTCGAAATCGTCGCAGATACCTGTGGCCGACACGATACC
CTTGGCGGAGCGTGTGCGACTGAGAGTAACTGTGCGCTATTCAATTGGATAAGAAATGC
ATGCATGCATGTCGTGATAGTTGGTTATTGGCTGTTGCGGAGAATGAAGAATTTGGTATG
TCGAAGCGTGATATTACCATAACATCAATTTCTTCATGAATGTGCCTATCACCCAAGAA

GGTGGTTTGAGCTTCGCTGATGGCATCAGTGGTGCGGGTAAATACGTAGAGCTCAAAGCT
 CATATGGACACCATCGTTCTAATGTGCAACTGCCACAACCTGAATAACCCGTGTAATGCC
 TACAACCAACCCCGGTTGAAGTCATTGTCTGGGAATAA

>FIG|6666666.266907.PEG.666 ALLOPHANATE HYDROLASE (EC 3.5.1.54)
 [VIBRIO G62 SP.]

ATGACAGATTCAACGAAAAATCAGCAGGCTGCATCGGAGCCAATGACCATTTCGTGGCTTA
 CATGAGGCGTATCGTAGTGGTGAGCTCAATGTGGAACATTTTCTAAGAAGCAAACCTTGAA
 CAGGTTTCGAGCGGATCAATCCAATGCTTGGCTCTCAGTTATTTCTGACCAGCAAACCTGGAT
 GATTATCTATCCGAATTGGTGAAGTCAAGATATTGATCAGTTCCCTTTGTTTGGCGTGCCT
 TTTGCGATCAAAGACAATATCGATTTACATGGGCTGGATACTACAGCGGGCTGTGATGCC
 TACCGTTATCAACCCCTCTGAATCGGCCTATATAGTTAAGCAGCTGATCAAGGCTGGTGCA
 GTGCCCTTTAGGTAAGACGAGCCTTGATCAGTTTGAACCGGTTTAGTGGGGACACGCAGT
 CCTTGGGGAGCCGTGAACAACAGCTTTGACGCTGACTATATTTCAAGGTGGTTCAAGCTCT
 GGCAGTGCAGTCTCTGTGCGCCACCAACCAAGTTTACTTTGCATTGGGTACAGACACTGCC
 GGTTTCAGGTGCGGTACCTGCTGCCTTCAATAACCTCTACGGCTTGAAGCCAAGCAAGGGG
 CTGTTAAGCTGTAGCGGTGTCGTTCCCTGCATGTCGTACATTGGATTGTGTGACATTCCTTT
 ACCAAAAGCGCAGAAGATCTGAGTCGGCTCTATCAAGTAGGGACGAGCTATGATGAGAGC
 GACTGCTATGCGCGTTATGCGATTGAGCAAGGGCTTGAAGTAACCACTCAGTTTCTGGA
 TTAAGAGTCGGTGTTCATCTGAAGAGCAGCTTAAATTCCTTTGGTAACGAAGAGTATCGT
 AAGCTCTACGCTCAGTCGGTGGCTCGCCTTGAGTCACTAGGTGCAGAGGTCATTCCATTC
 GATCTCTCGCCATTTATCGAGGCTGCCAACCTTCTCTACCAAGGTCCTTGGGTTGCGGAA
 AGGTATGCTGCGATTGAATCCTTCTTCAATAATAATCAAGAGCAGTGCTTGGATGTGATT
 CAAACCATTGTCGGCGGAGCTAAAGACCTTTCAGCAGCTGATACCTTTAAAGCCATGTAT
 CAACTGCAAGCGTTTAAAGTTCGAGTTCGATCAATTGATGGATGATGTTGATGCTGTGCTG
 ACGCCAACCGCAGGCACCATCTACACCATCGATGAAGTGAACAACGACCCGATTGCTCTA
 AACAGCAACCTTGGTTACTACACCAACTTCATGAACCTACTCGACTACAGCGCGATTGCG
 ATGCCCTGCAGGTTTCACTGAAGCTGGGCTACCGTTTGGCGTCACCCTGTTTCGCTCAAGCC
 TTCCAAGACGAAGCCTTGATTGCGCTAGGCAAAGAATGGCAACAGGTGATGAACTTACCT
 TTGGGTGCGACACTGGTTGAGCTTGATGGCGTTGAAAGTGTGATTTGCTGGTATGTGGT
 GCTCACATGAAAGACCTGGCACTTAACCATCAACTCATAGAATTAGGTGCGAACTTTAAG
 CTGCGTACTACCACATCAGAGAGTTATTCTCTGTACTGTCTTGCGGGTGGACCACCACTG
 AGACCAGGCCTAGTACGCAACCCAAACCAAGGCCAAAAGATAGAAGTCGAAATTTGGCGA
 GTGCCGAAAAACAGTTGGGAGCATTATTGGTGCAAATTCACATCCTCTGGGCTTGGGT
 AGTGTGAGATTGATTCTGGTGAATGGGTAAAAGGCTTTATCTGTGAAGGGATTGGAATC
 GAAGGGGCAACCGACATCAGCAAAACCGCGGATGGCGCTATTTTCTTGAAGAAATCTAA

>FIG|6666666.266907.PEG.665 UREA CARBOXYLASE (EC 6.3.4.6) [VIBRIO G62
 SP.]

ATGTTTAGTAAGGTGTTAATTGCTAATCGTGGTGCCATTGCCTGCCGAGTTATCCGTACA
 TTAAAACAACCTCAATATCGGAAGTGTGGCTGTTTACAGTGAGGCTGACGCTCAAAGTCTC
 CATGTCGTTGGCGCTGATGAGGCCTACTCTTTAGGTTCAGGGTGGCGCAACCGAGACCTAC
 CTTGATCAAGACAAAATTATCACTATTGCCAAAGAGTCGGGAGCGCAAGCCATTCACCCT
 GGCTACGGCTTCTTGAGTGAAAACCTGAGTTTGTGTAACGCTGCGAACAAGAAGGATTG
 GTCTTTTTTAGGACCAACAGCAGAACAATGCGAGCGTTTGGCTTAAAGCACTCTGCACGT
 AATATCGCAACTCAAGCGAATGTGCCACTACTCCCTGGTACCGACTTATTTAAAAGACAAG
 CAACAAGCACTTCAAGAAGCAGAAAAAATTGGCTATCCAGTCATGCTAAAAAGCACTGCG
 GGTGGCGGTGGTATAGGCATGCAGTGCTGTTTTACAGAGCAAGAGCTCGACGATGCTTAT
 GATAGCGTGAAGCGATTGAGTGAAAACAATTTCAAGTAACAGTGGTGTGTTTCATTGAGAAA
 TTTATCCAGCAAGCGCGCCATATTGAAGTTCAGATTTTTGGTGATGGGCAAGGCCATGTG
 GTGGCGTTGGGTGAACGTGATTGCTCCGCGCAGCGTCGCAACCAGAAAGTGAATTGAAGAG

ACTCCTGCACCTAACCTCAATGATGAAACGCGAGTTAAATTACAAGATACAGCTGTACGC
CTTGCGAGCGAAGTGAACCTATCGCAATGCGGGTACCGTTGAGTTCGTATTGGACCAGCAA
ACACAAGCGTTCTATTTCTTAGAAGTGAATACCCGCCTACAGGTAGAGCATGGTGTAAAC
GAAGAAGTGTGGCGTGGATCTTGTGTAATGGATGGTTCGCCAAGGGGCAGAGCAGCTA
GAGCTAGAGACACTGGGTGCTAATCTTAAATCACAAGGTCATGCTATTCAGGTTTCGCCCTT
TATGCCGAAGATGCCAACAAAACTTTCAGCCATGTGCAGGCTTATTAAGCCATGTTGAA
TGGGCGGAGCAAGAGAATCTGCGCATTGAGCACTGGATAGAAGCGGGCGTTGAAATCTCA
CCATTTCTTTGACCCGATGCTGGCTAAGGTGATTGTTTCATGAGGCTGACAGAGACACAGCA
CTTGCAGAGCTCAAGCGAAGCCTCAATACGAGTACGATCTACGGCATAGAGCATAACAAG
GCGTATTTGAGCCAACTATTAGCCAGCGAACTGGTGAAGAAAGGTGAGGTGCTAACGCAA
TCCCTCAATACTTTTGAGTTCAAACCCAATACCTTCGACGTCATCAGTGGCGGAACCCAA
ACGACGATTCAAGATTACCCAGCTCGTACAGGTTATTGGGACATTGGCGTGCCTCCATCT
GGCCCTATGGATGCGCTCAGCTTCCGTTTAGGCAATACACTACTTGGCAATGAAGCATCA
TGCGCAGGCTTAGAAATCATCGTTTCTGGCCCAACGCTTAAATTTAATCAAGAAACAAGA
ATCGCTCTGACAGGTGCAGCCATCCAAGCCTCGTTGGATGGTGAAGCAATTGAAATGAAT
ACCGCCATTGAGGTTGAATCAGGCCAAACGCTTAAAGCTCGGTAAAGTCTTTGATGGTGCT
CGTACATACATTGCGCTGCAAGGTGGGATTGATTGCCCTGAATATCTTGGTAGCCGCTCA
ACCTTCACGTTAGGTCAGTTTGGTGGTCACGCAGGACGTGCTCTGGTAGCGGGGATGTA
CTTCATATTGGCCAAACAGCTCAGACAACAAGACCGACGTATCTTCTGTAGTTCAGCCA
GAATTTAACGGTGAATGGCAGATCCGCGTAATTTACGGCCCTCACGGTGCACCAGATTTT
TTACTCAAGAGGATATCGATACCTTCTTTGATGCCGAGTGGAAAGTGCACTTTAACTCA
AGTCGCACAGGTGTTTCGCTTAATCGGTCTTAAACCTAACTGGGCTCGTTCTGATGGTGGC
GAGGCAGGGCTTCACCCATCCAACATCCATGACAACGCGTATGCGGTGGGCACCATCGAT
TTCACGGGTGACATGCCAGTTATCTTAGGTCCAGATGGCCCAAGCCTCGGTGGTTTTGTC
TGTCTGCGACGATCATTAAAGCCGATCTTTGGAAGATGGGGCAGCTTAAAGCGGGAGAC
AAAATTCGATTTACCCCGGTATCGGTAGAAGATGCGGAGCTTGCCGAACGCGCGCAGCTT
ACTCAGATTGAAACGGGTGTTATCGATGAAATGACATTGCCTACCGCAGAGCTCGATTCT
CCGATCATCAAGACTATCCCAGCAAGCCAATACGGTGAACAAGTGGTTTTATCGTCCAAGC
GGTGAAGATTACCTGCTGGTGGAGTATGGCCCGCAGATGCTCGATATTCGCCTACGTTTC
CGAGTCCACGCATTGATGCTAAAGCTTCAAGATAGAAAGCTGGCTGGCGTAGAGGAGCTG
ACACCAGGTATTCGTTCCCTACAGATTCAATACGACAATTTGCTGTTGCCAAGAGAGCAA
TTGCTTGACGAGCTCGAAGCGATAGAAGCAACGCTTGATAACATTGATGAACTCACTGTC
CCTGCTCGTGTGTGCATGTGCCGCTGTCTTGGGATGACGAAGCGACGCGACTGGCGATC
CGTAAATACGATGAAGTGGTGCGTAAAGACGCGCCTTGGTGTCCGGATAACATTGAGTTT
ATCCGTCGAATCAATGGGCTTGATTCTGTAGACGACGTAAAGCGCATTGTGTTTATGCA
AGCTATTTAGTCATGGGGCTAGGGGATGTCTATCTAGGTGCGCCAGTGCACAACGCCAATG
GATCCACGACACCGTTTTAGTGACTACAAAGTACAATCCTGCTCGAACTTGGACGCCTGAA
AATGCGGTCCGCATTGGTGGCGCGTACATGTGTGTCTATGGAATGGAAGGTCCGGGTGGT
TATCAGTTTGTGCGTGAACCTCTGCAGATGTGGAATCGCTACCGTCAAACAGAAGCGTTT
ACCAAGCCTTGGCTGCTGCGCTTTTTTCGACCAGATAAAGTTCTACGAAGTGAAGTGTGAA
GAGCTGCTCGATATTCGTGAGAAACACCCGCAAGGGCACTACCCAGTCAAGATTGAGGAG
ACAGAGTTCTCTCTTGAAGCTACCAATCACTTCTAGATGAGCATTCCGATGAAATCAAG
TCGAGTAAAGCTCGTCAGCAAAAAGCATTGGAAGAAGAAAGACAACGTTGGGAAGACTCA
GGGCAAGCGAATTTTGTGCAACTGAACTGGAGCAGTCGAGCGTCCAAACTGAGCTAGAA
GAGGGTCAGGAAGCGATAGAAAGCCATGTGGCCGTAATATTTGGCAGGTGTTGGTTCGAG
CCAGGCCAAACGGTGAAGAGAATGACGTTGTGATGATTCTGGAAGCGATGAAAATGGAG
CTTGAAGTCAACGCGAGTGTCTTGGTGTGGTTCGATTCAATTTGCCATGACGCAGGTGCT
CAAGTACATGCGGGTGAAGCACTTCTTGTGTAATACTTGTGCAGCATAA

APÊNDICE C – ARTIGO DE DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES *Vibrio maerlii* sp. nov.E *Vibrio rhodolitus* sp. nov.

GENOME SEQUENCES



Genome Sequences of *Vibrio maerlii* sp. nov. and *Vibrio rhodolitus* sp. nov., Isolated from Rhodoliths

Camila S. F. Silva,^a Juline M. Walter,^a Maria S. Nobrega,^a Gabriela Calegario,^a Luciana R. Appolinario,^a Luciana Leomil,^a Giselle Cavalcanti,^a Bruno S. Silva,^a Gizele D. Garcia,^{a,b} Diogo Tschoeke,^a Jean Swings,^a Fabiano L. Thompson,^{a,c} Cristiane C. Thompson^a

^aInstitute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bDepartamento de Ensino de Graduação, Universidade Federal do Rio de Janeiro—Campus UFRJ—Macaé Professor Aloisio Teixeira, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil

^cSAGE-COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT We report here the genome sequences of the novel isolates G62^T and G98^T from rhodoliths. The nearly complete genomes consisted of 4.7 Mbp (4,233 coding sequences [CDS]) for G62^T and 4.5 Mbp (4,085 CDS) for G98^T. Genomic taxonomy places these new genomes into 2 new species.

The genus *Vibrio* and 6 other genera (*Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, and *Salinivibrio*) form the family *Vibrionaceae* (1). These bacteria are Gram-negative fermentative, halophilic, mesophilic, chemoorganotrophic, and ubiquitous in the marine environment (2).

The aim of the present study was to determine the genome sequences of the novel isolates G62^T and G98^T. These isolates were obtained from rhodoliths at a 43-m depth (sinkhole, Abrolhos Bank, Brazil, 17.81399°S, 38.24306°W and 17.81330°S, 38.23744°W) in 2010. Samples were cultured in marine agar and incubated at 30°C for 48 h. Genomic DNA was extracted with the NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) and used for 300-bp paired-end library preparation with the Nextera XT DNA sample preparation kit and sequencing on the MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) (3). The sequences obtained were preprocessed with PRINSEQ software to remove reads smaller than 35 bp and low-score sequences (Phred < 30) (4). Sequence reads were assembled with A5-miseq software v. 20160825 (5). A second assembly was performed with CAP3 software (6). The gene prediction and functional annotation were performed with the Rapid Annotation using Subsystem Technology program (7).

The reads from G62^T were assembled in 49 contigs (N_{50} 382,658 bp). The estimated genome size is 4,758,035 bp (G+C content, 44.5%) with a coverage of 108-fold. In total, 4,233 coding sequences (CDS), 143 RNAs, 106 tRNAs, and 26 rRNAs were identified. G98^T reads were assembled in 62 contigs (N_{50} 161,850 bp). The estimated genome size is 4,559,723 bp (G+C content, 45.2%) with a coverage of 94-fold. In total, 4,085 CDS, 143 RNAs, 108 tRNAs, and 24 rRNAs were identified.

The novel isolates G62^T and G98^T had less than a 95% average amino acid identity/average nucleotide identity (AAI/ANI) and less than a 70% genome-to-genome distance (GGDH) from their closest neighbors (*V. atypicus* and *V. tubiashii* and *V. ponticus* and *V. furnissii*, respectively). The cutoffs used for the delimitation of *Vibrio* species are more than 95% AAI and more than 70% GGDH, and so we conclude that the 2 novel isolates belong to novel species of the genus (8–11), designated *V. maerlii* G62^T sp. nov. and *V. rhodolitus* G98^T sp. nov. Their cells are motile, and growth occurs between 12 and 35°C in the presence of 1.0 to 3.0% NaCl. Optimum bacterial growth occurs between 27 and 30°C in the presence of 3.0% NaCl. Colonies are cream colored and circular with the entire margin on marine agar. Useful *in silico* phenotypic features to differentiate the

Received 22 August 2018 Accepted 17 October 2018 Published 15 November 2018

Citation Silva CSF, Walter JM, Nobrega MS, Calegario G, Appolinario LR, Leomil L, Cavalcanti G, Silva BS, Garcia GD, Tschoeke D, Swings J, Thompson FL, Thompson CC. 2018. Genome sequences of *Vibrio maerlii* sp. nov. and *Vibrio rhodolitus* sp. nov., isolated from rhodoliths. *Microbiol Resour. Anounc.* 7:e01039-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01039-18>.

Editor Iddo Friedberg, Iowa State University
Copyright © 2018 Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Fabiano L. Thompson, fabianothompson1@gmail.com, or Cristiane C. Thompson, thompsoncristiane@gmail.com.
C.S.F.S. and J.M.W. contributed equally to this work.

Downloaded from <http://mra.asm.org/> on November 20, 2018 by guest

TABLE 1 *In silico* phenotypic characterization distinguishing *Vibrio maerlii* sp. nov. strain G62^T and *Vibrio rhodolithus* sp. nov. strain G98^T from closely related *Vibrio* species^a

Property	<i>V. maerlii</i> G62 ^T	<i>V. rhodolithus</i> G98 ^T	<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809 ^T	<i>V. furnissii</i> NCTC 11218 ^T	<i>V. parahemolyticus</i> RIMD 2210633 ^T	<i>V. ponticus</i> CECT 5869 ^T	<i>V. scophthalmi</i> VS-12	<i>V. tasmaniensis</i> LGP32	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19109 ^T	<i>V. xulli</i> DSM 17185 ^T
L-Arabinose	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–
Sucrose	+	–	+	+	–	–	–	–	+	–
Ornithine	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Voges	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Galactose	–	–	+	±	+	–	–	–	–	–
Cellulose	–	+	±	–	–	+	–	–	–	+
D-Mannitol	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+
Arginine	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+
Trehalose	–	–	+	+	+	–	–	+	–	+
D-Sorbitol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Indole	+	+	±	–	+	+	+	+	+	+
D-Inositol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Mannose	–	+	±	+	+	+	+	+	–	+

^aClosely related *Vibrio* species (RefSeq assembly accession number) include the following: *V. fluvialis* ATCC 33809^T (GCF_001558415), *V. furnissii* NCTC 11218^T (GCF_000176175), *V. parahemolyticus* RIMD 2210633^T (GCF_000196095), *V. ponticus* CECT 5869^T (GCF_001939685), *V. scophthalmi* VS-12 (GCF_001685465), *V. tasmaniensis* LGP32 (GCF_000091465), *V. tubiashii* ATCC 19109^T (GCF_000772105), and *V. xulli* DSM 17185^T (GCF_001274855). +, present; –, absent; ±, variable.

novel species from their closest neighbors include sucrose, indole, D-mannitol, cellobiose, and D-mannose (Table 1).

Description of *Vibrio maerlii* sp. nov. *Vibrio maerlii* (ma.er' .li. i. L. n. maerlii, referring to the Breton word "maërl" = rhodolith). The estimated genome size is 4.7 Mbp, and it has a G+C content of 45.2%. G62^T is positive for sucrose, indole, and D-mannitol based on an *in silico* phenotype (12).

Description of *Vibrio rhodolithus* sp. nov. *Vibrio rhodolithus* (rhod.o.li' .tus. L. masc. rhodoliths, referring to the isolation source, the rhodolith structures dominated by free-living coralline algae). The estimated genome size is 4.5 Mbp, and it has a G+C content of 44.5%. G98^T is positive for cellobiose, indole, and D-mannose based on an *in silico* phenotype (12).

Data availability. *V. maerlii* G62^T and *V. rhodoliths* G98^T are deposited in the Bacteria Collection of Environmental and Health (CBAS) at the Oswaldo Cruz Institute (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil (<http://cbas.fiocruz.br/>), under the accession numbers CBAS 711^T and CBAS 710^T, and in the Collection of Aquatic Microorganisms (CAIM) in Mazatlán, Sinaloa, Mexico (<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>), under the accession numbers CAIM 1940^T and CAIM 1941^T, respectively. The whole-genome shotgun projects for *V. maerlii* G62^T (= CBAS 711^T = CAIM 1940^T) and *V. rhodoliths* G98^T (= CBAS 710^T = CAIM 1941^T) have been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers QRHC00000000 and QLYZ00000000, respectively. The BioProject accession numbers are PRJNA476538 and PRJNA476543, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq, CAPES, and FAPERJ for their financial support.

This paper is part of the M.Sc. requirements of C.S.F.S. at the Marine Biotechnology Graduate Program of the Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM).

REFERENCES

- Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL. 2007. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* 189:7932–7936. <https://doi.org/10.1128/JB.00693-07>.
- Thompson FL, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>.
- Walter JM, Tschoeke DA, Meirelles PM, de Oliveira L, Leomil L, Tenório M, Valle R, Salomon PS, Thompson CC, Thompson FL. 2016. Taxonomic and functional metagenomic signature of turfs in the Abrolhos reef system (Brazil). *PLoS One* 11:e0161168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161168>.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>.
- Coil D, Jospin G, Darling AE. 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31:587–589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868–877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R.

2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:206–214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
8. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H-J, Ludwig W, Kämpfer P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>.
 9. Rosselló-Móra R, Amann R. 2015. Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea*. *Syst Appl Microbiol* 38:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.001>.
 10. Thompson CC, Amaral GR, Campeão M, Edwards RA, Polz MF, Dutilh BE, Ussey DW, Sawabe T, Swings J, Thompson FL. 2015. Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? *Arch Microbiol* 197:359–370. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1071-2>.
 11. De Vos P, Thompson F, Thompson C, Swings J. 2017. A flavor of prokaryotic taxonomy: systematics revisited, p 29–44. *In* Kurtböke I (ed), *Microbial resources: from functional existence in nature to applications*. Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands.
 12. Amaral GRS, Dias GM, Wellington-Oguri M, Chimetto L, Campeão ME, Thompson FL, Thompson CC. 2014. Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:357–365. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057927-0>.