

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Influências do espaço e do tempo nas comunidades
microbianas ao longo do Rio dos Sinos**

Luiz Felipe Valter de Oliveira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientação: Rogerio Margis

Porto Alegre, maio de 2015

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (Centro de Biotecnologia – UFRGS), sendo este subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais, meu irmão e, especialmente, à Ana e meu orientador e amigo, Rogerio Margis, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incondicionalmente, durante a trajetória deste trabalho.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	7
1. DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA	8
1.1. O QUE SÃO MICRO-ORGANISMOS?.....	8
1.3. DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA E OS AMBIENTES AQUÁTICOS.....	10
2. SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DO GENE rRNA 16S E ABORDAGENS COMPUTACIONAIS	12
3. ÁREA DE ESTUDO: RIO DOS SINOS	17
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	19
1. OBJETIVO GERAL	20
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO III – THE SOURCE OF THE RIVER AS A NURSERY FOR MICROBIAL DIVERSITY	21
CAPÍTULO IV – SPATIAL AND TEMPORAL INFLUENCES ON SHORT TERM AND LONG TERM MICROBIAL RIVER DYNAMICS	23
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
1. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS:	38
ANEXO 1: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR.....	39
ANEXO 2: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR.....	40
ANEXO 3: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.	41
ANEXO 4: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.	42
ANEXO 5: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.	43
ANEXO 6: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.	44
ANEXO 7: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO.	45
ANEXO 8: OUTROS ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO EM COLABORAÇÃO.	46
ANEXO 9: OUTROS ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO EM COLABORAÇÃO.	47
ANEXO 10: OUTROS ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO EM COLABORAÇÃO.	48
ANEXO 11: OUTROS ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO EM COLABORAÇÃO.	49
ANEXO 11: OUTROS ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO EM COLABORAÇÃO.	50

RESUMO

Ambientes aquáticos são essenciais para quase todas as formas de vida na Terra. Suas comunidades microbianas são responsáveis por controlar processos biogeoquímicos importantes nestes ecossistemas. Nos últimos anos, ocorreu um considerável aumento no número de estudos relacionando fatores e processos ambientais e comunidades microbianas em ambientes aquáticos. Uma das principais razões para o crescimento destes estudos foram os avanços das tecnologias de sequenciamento de DNA, que permitiram o desenvolvimento de novas abordagens, proporcionando um momento único para o campo da microbiologia. A aplicação de sequenciamento de nova geração para analisar regiões do gene do RNA ribossomal *16S* (*rRNA 16S*) tem sido amplamente utilizada para a compreensão da composição, estrutura e respostas ambientais do bacterioplâncton. Os rios são ambientes importantes, tanto em uma perspectiva ecológica quanto econômica. No entanto, a base de nosso conhecimento sobre a dinâmica microbiana aquática se baseia principalmente em estudos ambientais de água do mar e lagos. Nesta tese, foi realizado o sequenciamento em larga escala da região V4 do gene *rRNA 16S* em amostras coletadas ao longo do Rio dos Sinos. Este rio está localizado em um dos centros industriais brasileiros mais importantes e apresenta várias características ambientais contrastantes, além de um gradiente longitudinal de eutrofização, assim, tornando-se um local notável para o estudo da dinâmica do bacterioplâncton. Neste trabalho, foi testada a influência do espaço e do tempo como variáveis para o processo de estruturação das comunidades microbianas, bem como influências sazonais e longitudinais para suas dinâmicas ecológicas. Foram demonstradas evidências consistentes para a existência de um perfil bacteriano na nascente do rio e a sua persistência ao longo do curso de água analisado. Mudanças sazonais reforçam a importância da nascente do rio na manutenção do reservatório bacteriano que é dispersado ao longo de todo o rio. Além disso, também existe uma pequena influência do espaço para determinar a estrutura das comunidades microbianas onde, amostras separadas por 63 km de curso de água são quase tão semelhantes entre si quanto as amostras de um mesmo local, coletadas com uma diferença de 15 minutos. Portanto, a preservação da fonte do rio é importante não apenas por razões hidrológicas, mas também para manter a composição e a integridade microbiana do rio.

ABSTRACT

Aquatic environments are essential for almost all Earth living forms. Their microbial communities are responsible for driven the most important biogeochemical processes in these ecosystems. Only in the past few years, we began to understand about the factors and processes that orchestrate the microbial community in these environments. One reason for this delay was the lack of proper tools. With advances in new sequencing technologies, new approaches are providing an unique moment for the microbiology field. The application of next-generation sequencing for *16S* rRNA analysis has been broadly used for understanding bacterioplankton composition, structure and environmental responses. Rivers are important environments, for both ecological and economic perspectives. However, the basis of our knowledge about aquatic microbial dynamics relies mostly in seawater and lakes environmental studies. We performed high-throughput analysis of *16S* rRNA highly variable V4 region in samples from the Sinos River, which is located in one of most important Brazilian industrial centers. This region has several contrasts in its environmental characteristics, presenting a longitudinal gradient of eutrophication and making it a remarkable study site for observing the dynamics of bacterioplankton. In this work, we tested the influence of space and time as variables for the microbial community structuring process, as well as, seasonal and longitudinal influences for their ecological dynamics. We demonstrated consistent evidence for the existence of a bacterial seed-bank and its longitudinal persistence. Seasonal shifts reinforce the importance of the source of the river in maintaining the bacterial seed-bank that spreads throughout the river. Besides, our results also suggest a lower influence of the space to determine the microbial community structure, where, samples separated by 63 km of watercourse are almost as dissimilar as the samples from the same site, collected with a difference of fifteen minutes. Therefore, the preservation of the source of the river is important not only for hydrologic reasons but also to maintain the microbial composition and the ecological integrity of the river.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1. Diversidade Microbiológica

1.1. O que são micro-organismos?

Os termos “micro-organismos” e “micróbios” não possuem definição formal, mas genericamente referem-se a qualquer forma de vida, incluindo organismos unicelulares, multicelulares e vírus, somente visíveis em microscópios (Pace 1997; Martiny *et al.* 2006), assim como a primeira descrição publicada de um micro-organismo: um micro fungo descrito por Robert Hooke em 1665, representado na Figura 1. Entretanto, estes dois termos, quando citados, geralmente referem-se com mais ênfase aos domínios Archaea e Bacteria (Woese, Kandler & Wheelis 1990), uma vez que esses grupos representam, tanto em abundância como em diversidade, a maior proporção dessa categoria de organismos (Wu *et al.* 2010). Assim, no decorrer deste trabalho, os termos “micro-organismo” e “micróbios” serão utilizados com ênfase em Archaea e Bacteria (Woese *et al.* 1990)

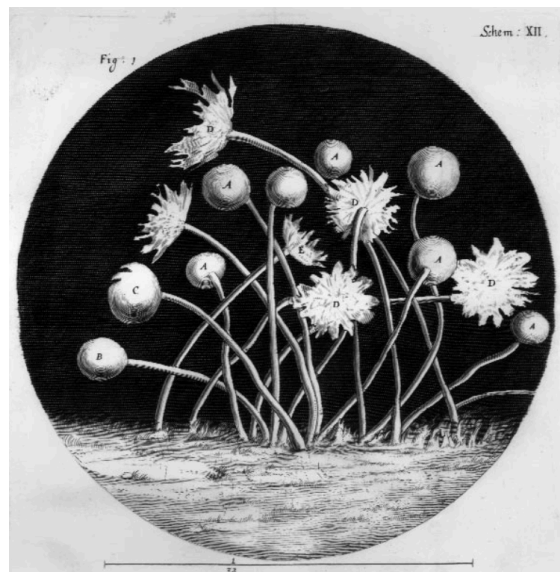


Figura 1: Imagem da primeira descrição publicada, por Robert Hooke em 1665 (na *Micrographia*), de um micro-organismo, a qual mostra uma colônia de um fungo microscópico. Obtido em DOI: 10.1098/rsnr.2004.0055

Os micro-organismos representam a forma de vida mais diversa, abundante e cosmopolita, ocupando praticamente todos os nichos ecológicos disponíveis.

O domínio Bacteria, ou apenas bactérias, representa o grupo mais basal e mais diverso entre os três domínios da vida (Archaea, Bacteria e Eukarya – Figura 2). Este grupo é amplamente estudado, sendo muitas vezes descrito como condutor de diversos processos, tais como os processos biogeoquímicos do ciclo do nitrogênio (Zehr & Ward 2002) e do carbono em ambientes aquáticos (Jiao *et al.* 2010), na fixação de nutrientes e processos fisiológicos em plantas (Bulgarelli *et al.* 2013), ou como moduladores da obesidade em camundongos (Ridaura *et al.* 2013).

As Archaea são micro-organismos mais raros nos ambientes em geral, porém, são frequentemente encontrados em ambientes extremos como, por exemplo, em ambientes com elevados níveis extremos de pH, temperatura e alcalinidade (Bowers, Mesbah & Wiegel 2009; Bowers & Wiegel 2011). Algumas Archaea possuem a capacidade de realizar metanogênese e metanotrofia, além de também participarem de processos biogeoquímicos, como o ciclo do carbono e do nitrogênio (Offre *et al.* 2013).

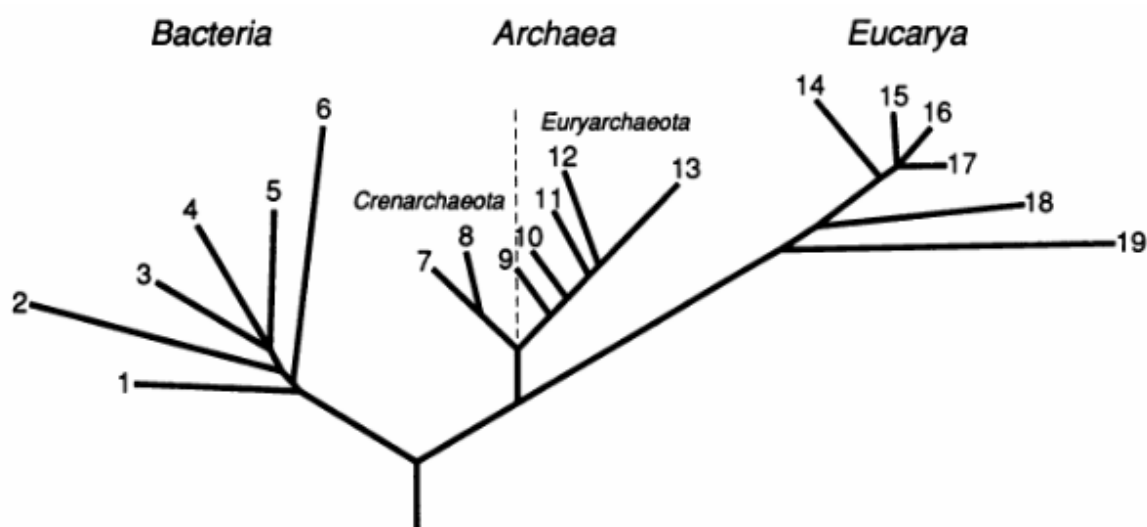


Figura 2: Filogenia que propõe a organização dos organismos celulares em três grandes domínios (Bacteria, Archaea e Eucarya). Obtido de Woese *et al.* 1990 DOI: 10.1073/pnas.87.12.4576

Devido a todas as características supracitadas, os micro-organismos correspondem a um grande reservatório genômico e proteômico de variabilidade. Esse reservatório corresponde a uma incalculável fonte de diferentes proteínas, enzimas e rotas metabólicas para produção de pequenas moléculas, e são responsáveis por muito dos avanços biotecnológicos, principalmente os relacionados à descoberta de novas enzimas e

bioprocessos, como nas indústrias de biocombustíveis, farmacêutica, química, produção de alimentos e biomédica (Schloss & Handelsman 2003; Lorenz & Eck 2005; McMahon, Martin & Hugenholtz 2007; Warnecke & Hess 2009; Duan *et al.* 2011; Ekkers *et al.* 2012).

1.2. Diversidade microbiana e os ambientes aquáticos

Desde os primeiros estudos sobre o papel dos micro-organismos nos ambientes aquáticos (Lindeman 1942), os mesmos foram reconhecidos como essenciais para estes ambientes, tanto para o funcionamento dos ecossistemas (Azam & Malfatti 2007; Falkowski, Fenchel & DeLong 2008; Newton *et al.* 2011), como para fontes de biomassa (Giovannoni & Stingl 2005; Inagaki *et al.* 2006; Zinger *et al.* 2011).

A base do conhecimento que existe atualmente, sobre a dinâmica dos micro-organismos em ambientes aquáticos, é principalmente alicerçada em estudos com ambientes marinhos. O oceano é o maior ambiente contínuo do planeta e acredita-se ter aproximadamente 1×10^{29} células de bactérias (Whitman, Coleman & Wiebe 1998). Esse grande volume de biomassa, associado a grande variabilidade de microambientes existente, reflete nas diversificadas comunidades microbianas caracterizadas nos diferentes microambientes (Sogin *et al.* 2006; Rusch *et al.* 2007). Trabalhos de séries temporais em ambientes marinhos sugerem que a sazonalidade é um dos principais fatores ambientais para a modulação dessas comunidades (Gilbert *et al.* 2009, 2012). Outras mudanças nos ambientes, como salinidade e pH, também influenciam diretamente a composição e estruturação das comunidades microbianas (Herlemann *et al.* 2011; Krause *et al.* 2012). Entretanto, parece existir um conjunto de micro-organismos que persiste através das estações (Caporaso *et al.* 2011b) e está disperso pelo oceano (Gibbons *et al.* 2013).

Os ecossistemas de água doce disponíveis na superfície terrestre representam 0,01% de toda a água do planeta e podem ser considerados os mais ameaçados do mundo, pois os declínios na biodiversidade parecem ocorrer mais rapidamente nesses ecossistemas comparados com os terrestres (Sala *et al.* 2000).

Infelizmente, a grande vulnerabilidade dos ambientes aquáticos dulcícolas, somada à baixa quantidade desse recurso disponível, tornam a água doce extremamente suscetível ao rápido crescimento populacional humano, urbanização, consumo insustentável,

agricultura, indústria e mudanças climáticas (Arnell 1999; Pahl-Wostl 2006; Arnell, van Vuuren & Isaac 2011).

Um estudo recentemente publicado aponta que em 2050, aproximadamente 1 bilhão de pessoas viverão em cidades com disponibilidade de água insuficiente para o consumo da população (McDonald *et al.* 2011), sendo estas previsões realizadas com modelos hidrológicos, projeções demográficas e cenários de mudanças climáticas. Com isso, a preservação, assim como a recuperação, de ambientes aquáticos é de suma importância, tanto para a manutenção da biodiversidade, quanto para políticas de saúde pública (Arnell 1999; Azizullah *et al.* 2011; Arnell *et al.* 2011; McDonald *et al.* 2011).

Devido ao papel chave que os micro-organismos desempenham em importantes processos, nos mais diversos níveis ecológicos, provavelmente, a forma como eles responderão aos distúrbios ambientais, poderá influenciar drasticamente na recuperação de um ecossistema. Pensando nisso, existe um esforço para tentar incorporar variáveis relacionadas às comunidades microbianas em modelos preditivos de impactos ambientais (Arhonditsis *et al.* 2006; Allison & Martiny 2008; McGuire & Treseder 2010). Porém, é necessária a produção de uma massa crítica de informações empíricas sobre a ecologia dos micro-organismos e de como eles respondem às mudanças ambientais, para que essas variáveis venham a ser definidas e ponderadas nesses modelos. (Arhonditsis *et al.* 2006; Allison & Martiny 2008; McGuire & Treseder 2010).

Com o aumento crescente na adoção de abordagens baseadas no sequenciamento de DNA em larga escala para estudos de comunidades microbianas, foi possível avançar no entendimento da dinâmica dos micro-organismos nos ambientes de água doce. Em lagos, que correspondem aos ambientes de água doce mais amplamente estudados, foi demonstrado que, após grandes distúrbios, comunidades foram capazes de se recuperar em sete dias no epilímnio e 11 dias no hipolímnio (Shade *et al.* 2012). Entretanto, outro estudo demonstrou que a variação entre o tempo e o espaço, para a estruturação de populações microbiológicas, são praticamente as mesmas, quando se comparam duas populações separadas por um metro de distância em um lago e uma população comparada com ela mesma, vinte e quatro horas mais tarde (Jones *et al.* 2012). Em contraste, os rios carecem de estudos focados na compreensão das comunidades microbianas, utilizando abordagens de sequenciamento de DNA. Alguns desses estudos preliminares sugerem que, assim como populações de lagos e mares, as populações de rios devem apresentar flutuações sazonais,

sendo esse padrão de variação previsível (Crump *et al.* 2009).

2. Sequenciamento em larga escala do gene *rRNA 16S* e abordagens computacionais

Durante muito tempo, a microbiologia dependeu da cultura de células para poder realizar a identificação taxonômica de bactérias. Além de não permitir a análise de micro-organismos não cultiváveis em laboratório, a identificação fenológica/bioquímica que requer, para alguns táxons, diversas etapas de cultura para obter o resultado final, acaba muitas vezes sendo inconclusivo. Com isso, pesquisas que necessitavam de escalabilidade, como por exemplo, a descrição e análise ecológica de comunidades microbianas, eram inviáveis, de serem realizadas.

Com o desenvolvimento das primeiras metodologias de sequenciamento de DNA e o sequenciamento do primeiro genoma completo de um micro-organismo (Sanger *et al.* 1977), um novo momento se iniciou para a microbiologia. Há exatos 10 anos após a publicação do genoma do PhiX147, Carl Woese publicou uma revisão na *Microbiological Reviews*, sobre evolução de bactérias, na qual fez uma análise minuciosa sobre as características evolutivas do genes ribossomais, explanando porquê esses genes deveriam ser utilizados como um marcador universal para bactérias (Woese 1987). Neste mesmo trabalho, Woese fez uma previsão otimista de que, em um tempo não muito distante, todo o laboratório bem equipado, teria a capacidade de produzir, em média, 100 sequências de *rRNA 16S* por ano.

Desde então, o gene *rRNA 16S*, o mais conservado entre os três genes presentes no operon de genes ribossomais (*5S*, *16S*, *23S*), passou a ser utilizado como padrão ouro para a identificação taxonômica baseada em sequenciamento de DNA (Figura 3).

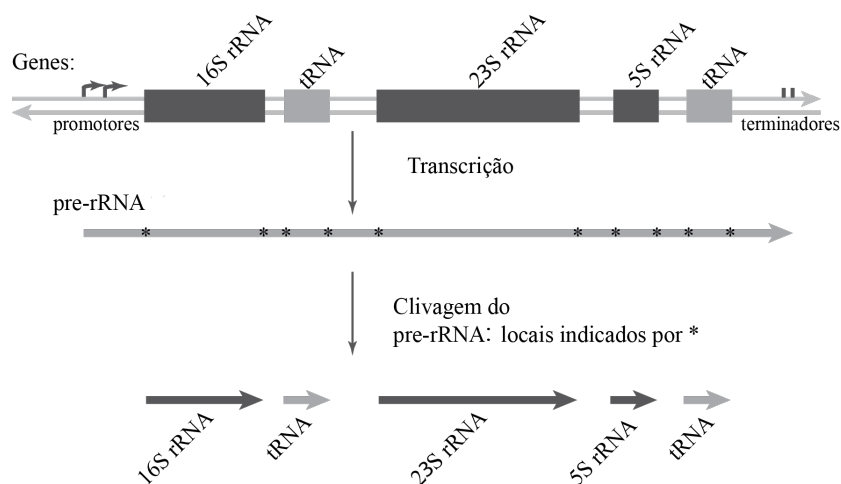


Figura 3: Esquema que representa o operon dos genes rRNA de bactérias. Os genes são transcritos como um RNA único, sendo posteriormente clivado em suas respectivas subunidades.

Os avanços na área da genômica, proporcionados pelas novas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho, viabilizaram, de forma drástica, a redução do custo do sequenciamento por nucleotídeo sequenciado (Figura 4). Ao mesmo tempo, permitiu o aumento da eficiência do sequenciamento (número de bases sequenciadas por evento de sequenciamento). Atualmente, um evento de sequenciamento utilizando a plataforma Illumina HiSeq 4000, tem a capacidade de produzir em 3,5 dias aproximadamente 5 bilhões de pares de base.

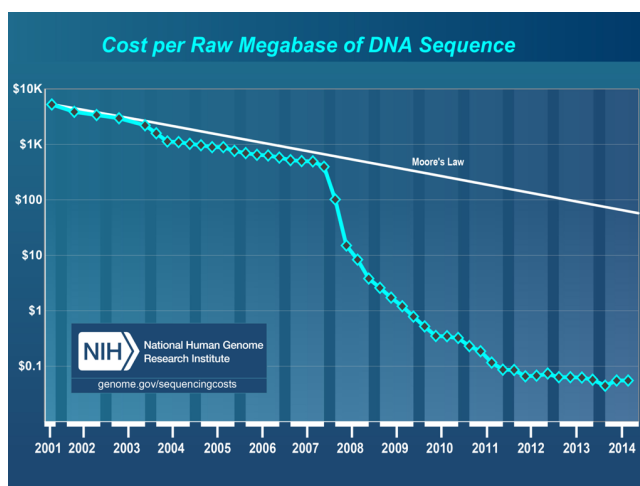


Figura 4: Demonstração da queda do custo por base nucleotídica sequenciada, comparada a lei de Moore, a qual preconiza que a cada 18 meses o número de transistores em um determinado chip aumentaria em 100%, mantendo o mesmo custo. Obtido de <http://www.genome.gov/sequencingcosts>, no dia 18/04/2015.

Com o uso destas novas tecnologias, diversas abordagens, baseadas em sequenciamento de DNA, tornaram-se economicamente e temporalmente viáveis. Como por exemplo, sequenciar o DNA e/ou o RNA total presente em um determinado ambiente e recuperar a informação de quais os micro-organismos e perfis metabólicos são representativos nesta amostra (Martins *et al.* 2013), ou ainda, sequenciar o genoma completo de uma única célula (Blainey 2013).

A combinação destas novas tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala, associadas com o sequenciamento de amplicons de *16S*, proporcionaram uma quebra de paradigma nos estudos de comunidades microbianas. Metodologias de preparo para amostra para sequenciamento de amplicons de *16S*, como a metodologia proposta por Caporaso e colaboradores (Figura 5)(Caporaso *et al.* 2011a), tornara-se amplamente difundidas, sendo a metodologia uma das mais utilizadas. Por ser bastante variada, a região V3/V4 do rRNA *16S* tem sido amplamente utilizada em estudos baseados neste marcador. Por estar flanqueado por regiões bastante conservadas, é possível, com determinados conjuntos de *primers*, analisar tanto bactérias como Archaeas (Wang & Qian 2009).



Figura 5: Esquema de amplificação do gene *rRNA 16S*, com primers carregando os adaptadores necessários para o processo de sequenciamento de DNA baseado na plataforma Illumina. Modificado de Caporaso et al. 2011a.

Com a adoção dessas novas abordagens, diversos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de caracterizar o perfil microbiológico de diferentes ambientes, tais como oceanos (Bodaker *et al.* 2010; Quaiser *et al.* 2010; Xie *et al.* 2010; Sauvadet, Gobet & Guillou 2010; Yooseph *et al.* 2010), cavernas (Engel *et al.* 2010), lagos (Djikeng *et al.* 2009; Debroyas *et al.* 2009), rios (Cottrell *et al.* 2005), estações de tratamento de efluentes (Rani *et al.* 2008), camadas internas de rochas profundas (Nyyssönen *et al.* 2014), entre

outros. Adicionalmente, essas abordagens também permitem analisar em paralelo diferentes grupos taxonômicos de micro-organismos, tais como bactérias (Li & Qin 2005; Cottrell *et al.* 2005), vírus (Djikeng *et al.* 2009) e protozoários (Ozutsumi *et al.* 2005).

Durante muito tempo, o principal desafio da era genômica, foi a produção de sequências de DNA. Com o advento do sequenciamento em larga escala, o desafio tornou-se ter a capacidade de analisar e interpretar o grande volume de dados atualmente gerados. A análise dos dados gerados pelo processo de sequenciamento de *amplicons* de rRNA 16S em larga escala, pode ser dividido em quatro principais etapas, descritas no organograma abaixo:



Destas etapas, a definição das OTUs (do inglês Operational Unit Taxonomy - Unidades Taxonômicas Operacionais) é uma das tarefas mais críticas e existem três principais estratégias que podem ser adotadas:

- :: Inferência por similaridade contra um banco de sequências de referência;
- :: Inferência baseada no agrupamento das sequências obtidas, contra elas mesmas, sem a utilização de um banco sequências de referências;
- :: Uma abordagem mista, na qual é utilizada um banco de sequências de referência, e as sequências que falharem, são agrupadas contra elas mesmas;

A primeira estratégia é a que possui um menor custo computacional, pois as sequências são comparadas contra um banco de sequências com taxonomia conhecida, geralmente utilizando-se algoritmos, como o BLAST (Altschul *et al.* 1990), CD-HIT (Fu *et al.* 2012) ou Uclust (Edgar 2010). Logo que uma sequência apresentar uma identidade de 97% com uma referência, ela herdará as informações de taxonomia e a posição em uma árvore filogenética previamente definida. Bancos de sequências de referências como o *greengenes* (<http://greengenes.secondgenome.com>) e o *Silva* (<http://www.arb-silva.de>), disponibilizam um banco de sequencias no formato *fasta*, uma filogenia no formato *newick*, e uma tabela com o código da sequência e a inferência taxonômica.

Na segunda abordagem, utiliza-se o agrupamento de todas as sequências, sem a utilização de um banco de referências, criando-se blocos de sequências que possuem 97% de identidade entre si. Cada um desses blocos representará uma OTU, sendo que a sequência central de cada bloco, será a sequência representante da OTU. Geralmente, para a inferência da taxonomia utiliza-se abordagens baseadas em aprendizagem de máquina, como por exemplo RDP (Wang *et al.* 2007), que utiliza o algoritmo Naive-bayes, para uma probabilidade para a classificação taxonômica de cada OTU nos diferentes níveis.

A terceira abordagem é uma mistura das duas primeiras, sendo que, primeiramente, as sequências são comparadas contra um banco de sequências de referência, e as que falharem nessa etapa, são agrupadas entre si, e seu centro será o representante da OTU, a qual receberá uma classificação taxonômica.

Adicionalmente, para a segunda e terceira abordagem, é conveniente a realização de uma análise filogenética. Para o alinhamento destas sequências, é recomendada a utilização de algoritmos que levem em consideração a estrutura secundária do rRNA, como o infernal (Nawrocki & Eddy 2013), sendo que, para as análises filogenéticas, o raxml (Stamatakis 2014), é um dos softwares mais utilizados.

Para as análises de alfa-diversidade, a qual determina a diversidade intra-amostra, utiliza-se a contagens de OTUs, ou métodos não-paramétricos como Chao1 (Chao & Lee 1992) e diversidade filogenética de Faith (Faith 1992). Para analisar a beta-diversidade, a qual representa a dissimilaridade entre as amostras, em termos de diversidade, o método Unifrac é geralmente utilizado, pois calcula uma matriz de distância não-paramétrica incorporando informações filogenéticas (Lozupone & Knight 2005; Lozupone *et al.* 2011).

3. Área de estudo: Rio dos Sinos

A Bacia dos Sinos localiza-se no leste do estado do Rio Grande do Sul, entre os paralelos 29° e 30° sul. Formada por 32 municípios, a Bacia dos Sinos possui uma área total de 3.800 km², sendo o Rio dos Sinos, seu principal curso de água (Comitesinos). A vegetação desta bacia é caracterizada por um encontro de diversas formações fitogeográficas, onde ocorrem a Floresta Ombrófila Mista nas nascentes do Rio Rolante (Floresta Nacional de São Francisco de Paula), Savana, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual e Áreas de Tensão Ecológica (Inventário Florestal Contínuo).

O Rio dos Sinos tem cerca de 190 km, sendo sua nascente no interior do município de Carará e sua foz, no município de Canoas. Os seus principais afluentes são: o Rio Rolante, o Rio da Ilha e o Rio Paranhana, sendo que todos estão à margem direita (sentido nascente - foz) e com nascentes na região serrana, principalmente nos municípios de São Francisco de Paula e Canela. O Rio dos Sinos está dividido em três trechos, relacionados com características hidrológicas e hidráulicas (FEPAM, 2011): i) Trecho superior – primeiros 25 km, desde a nascente, onde o rio apresenta alta declividade, entre a cota de 600 m até a cota de 60 m ; ii) Trecho médio – com extensão de aproximadamente 125 km, com declividade média, entre a cota de 60 m e 5 m. Neste trecho que o Rio dos Sinos une-se a seus principais afluentes, o Rio Rolante, o Rio da Ilha e o Rio Paranhana) Trecho inferior, – caracteriza-se por declividades suaves a quase nulas, ocorrendo alguns trechos de contra-declives, com formação de meandros e zonas de sedimentação (FEPAM, 2011; Comitesinos).

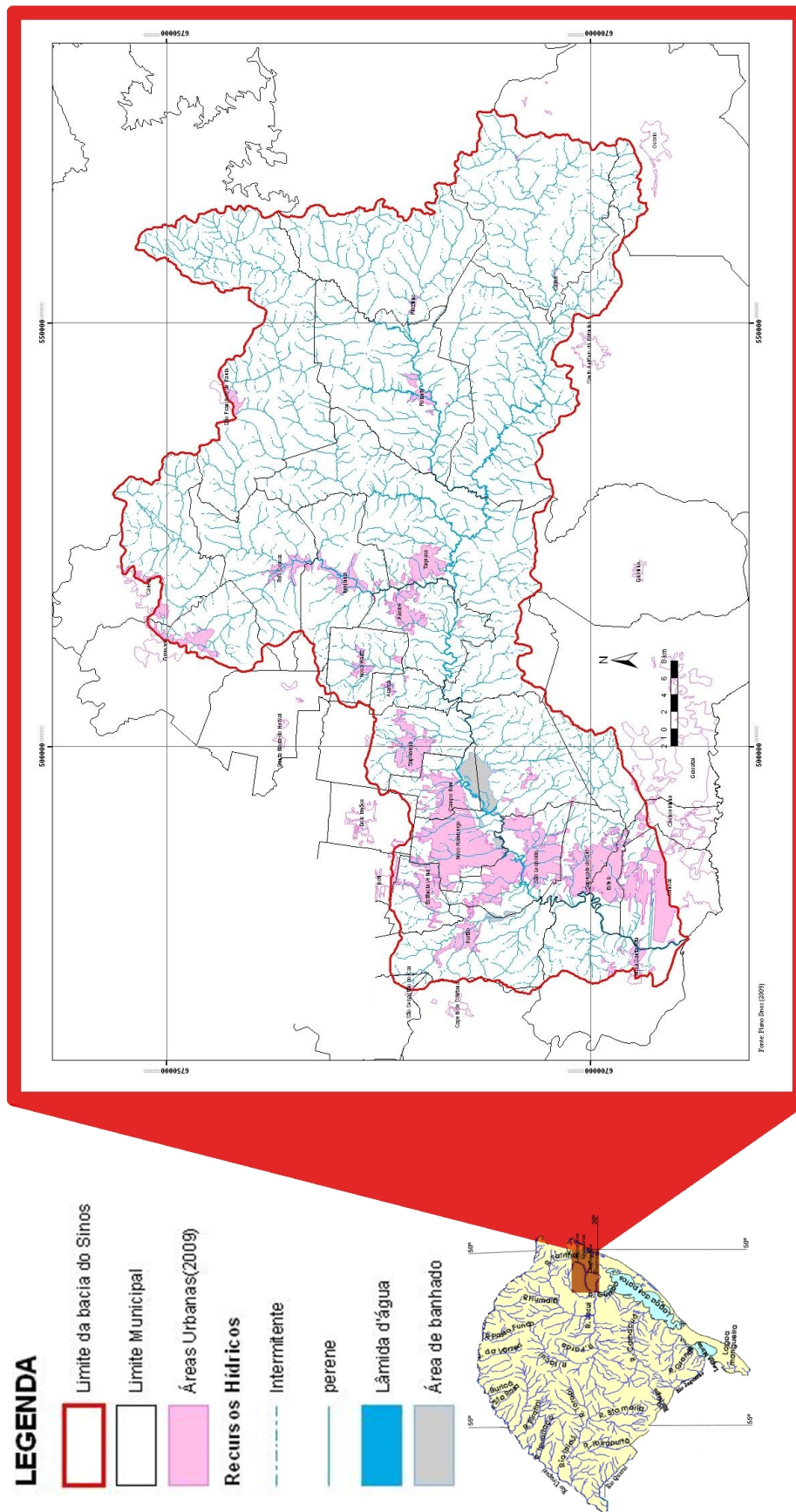


Figura 5 – Mapa com a apresentação da Bacia do Sinos. Modificado de:

http://www.comitesinos.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=27.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a biodiversidade de micro-organismos existentes no Rio dos Sinos, utilizando o sequenciamento de *amplicons* de rRNA *16S* em larga escala, e comparar suas relações ecológicas com a sazonalidade, variação temporal e espacial.

2. Objetivos específicos

1. Caracterizar qualitativamente e quantitativamente a biodiversidade das amostras coletadas nos cursos de águas do Rio dos Sinos;
2. Relacionar a biodiversidade encontrada com os parâmetros físico-químicos avaliados em cada amostra;
3. Avaliar a relação entre dados de densidade demográfica e atividades antrópicas nos locais de coletas com dados físico-químicos e de biodiversidade aquática;
4. Determinar, ao longo do curso de água, pontos de importância para conservação e manutenção da qualidade e biodiversidade do curso de água;

**CAPÍTULO III – THE SOURCE OF THE RIVER AS A
NURSERY FOR MICROBIAL DIVERSITY**

Artigo científico publicado no periódico *Plos One*.

“The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity”

Luiz Felipe Valter de Oliveira e Rogerio Margis

Citação:

de Oliveira LFV, Margis R (2015) The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. PLoS ONE 10(3): e0120608. doi:10.1371/journal.pone.0120608

**CAPÍTULO IV – SPATIAL AND TEMPORAL INFLUENCES
ON SHORT AND LONG TERM MICROBIAL RIVER
DINAMICS**

Manuscrito científico submetido ao periódico Water Research
(<http://www.journals.elsevier.com/water-research/>).

“Spatial and temporal influences on short and long term microbial river dynamics”

Luiz Felipe Valter de Oliveira e Rogerio Margis

Spatial and temporal influences on short and long-term microbial river dynamics

Luiz Felipe Valter de Oliveira^a and Rogério Margis^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil; ^bCentro de Biotecnologia and Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil.

*Corresponding autor

Luiz Felipe Valter de Oliveira:

Email: scryrps@gmail.com

End: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500, Predio 43431 sala 213, Porto Alegre, RS, BRA

Rogério Margis:

Email: rogerio.margis@ufrgs.br

End: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500, Predio 43431 sala 213, Porto Alegre, RS, BRA

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Discussão e conclusões finais

A utilização de metodologias que dispensam etapas prévias de cultura de bactérias está promovendo o maior avanço dos últimos tempos na área microbiológica, repercutindo nos trabalhos que vão desde estudos ecológicos (Caporaso *et al.* 2012; Gibbons *et al.* 2013; de Oliveira & Margis 2015) até aplicações em microbiologia clínica (Köser *et al.* 2012; Bertelli & Greub 2013). Como apresentado no capítulo I, desde 1942, diversos estudos foram conduzidos demonstrando a importância e o papel central que os micro-organismos possuem em processos biogeoquímicos, com modelos bem estabelecidos (Falkowski *et al.* 2008; Nagata *et al.* 2010; Offre, Spang & Schleper 2013). Em contraste, foram apenas nos últimos 10 anos que pode-se avançar em estudos de ecologia de micro-organismos de ambientes aquáticos, devido à falta de ferramentas que viabilizassem tais estudos.

Compreender como os micro-organismos respondem à sazonalidade, variações espaciais, temporais e ambientais, é imprescindível para o desenvolvimento de modelos preditivos robustos, que possam auxiliar na mitigação de impactos ambientais e de mudanças climáticas. Ambientes marinhos, como o canal da mancha, na Inglaterra, têm sido monitorados nos últimos anos (Gilbert *et al.* 2012), o que demonstrou que os micro-organismos são capazes de responder a essas variações de forma cíclica, pois aparentemente existe a manutenção de um repositório de bactérias, que retroalimentaria o sistema. Além disso, também foram verificadas variações cíclicas senoidais da alfa-diversidade, onde picos foram encontrados no inverno e vales no verão (Caporaso *et al.* 2011b; Gilbert *et al.* 2012).

Com o trabalho apresentado no Capítulo III, conseguimos mostrar que, assim como nos ambientes marinhos, nos rios, parece existir um repositório na nascente, que serve como base para a manutenção da diversidade microbiológica ao longo do rio. Interessantemente, os micro-organismos mais abundantes ao longo do rio estão presentes desde a nascente. Quando comparamos o perfil das OTUs encontradas nas amostras da nascente, no município de Caraá, com as amostras coletadas no município de São Leopoldo, foi possível verificar a existência de uma porção de OTUs que, aparentemente, eram específicas dessa região. Porém, a maior diferença que encontramos foi na estruturação das OTUs existentes desde a nascente.

Um estudo realizado em lagos no ártico demonstrou que tanto os *taxa* comuns

quanto os raros são fundamentais para a composição das populações, bem como os taxa de outros habitats são misturados e transportados entre diferentes ambientes ligados hidrológicamente (Crump, Amaral-Zettler & Kling 2012). Além disso, muitas das OTUs encontradas, aparentemente estavam incubadas no solo, e se mostraram quantitativamente importantes para a estruturação das populações em lagos, mesmo em ecossistemas como a tundra ártica, onde a maior parte do degelo da neve ocorre na primavera e flui ao longo dos solos ainda congelados. Em nosso trabalho publicado (de Oliveira & Margis 2015), demonstramos que, em rios, esse transporte pode ser realizado por mais de 100 km de curso de água, além de que, nesse caso, a nascente parece ser o principal reservatório para a manutenção da diversidade ao longo do rio.

Frente a distúrbios ambientais, existem quatro possíveis resultados para as comunidades microbiológicas: 1) a população é resistente, e a alteração ambiental não afetará sua estrutura populacional; 2) a população é resiliente o suficiente para se recuperar após o distúrbio ambiental; 3) as populações são recuperadas por repovoamento; ou 4) as populações são perdidas por não existir resistência, resiliência e nem repovoamento. Em lagos, estudos controlados de distúrbios ambientais demonstram que comunidades de epilimnio e do hipólimnio são capazes de se recuperar entre 7 e 11 dias, respectivamente (Shade *et al.* 2012), mostrando a capacidade de resiliência. Porém, outro estudo mostrou que, em apenas um metro de distância, a variação da população era a mesma daquela encontrada após um dia (Jones *et al.* 2012). No estudo apresentado no capítulo IV, demonstramos que os cursos de águas em rios são mais dinâmicos, uma vez que, mesmo após 63 km de percurso de água, as amostras não são significativamente diferentes do que uma amostra coletada no mesmo lugar, com 15 minutos de intervalo. Considerando esses resultados, é provável que em uma situação de distúrbios, as populações de rios tenham uma maior eficiência na recuperação do que em lagos, sendo esta uma variável importante a ser investigada.

Um dos pontos mais críticos para a obtenção de resultados consistentes é a utilização de um banco de dados de referência acurando. Muito das sequências obtidas por análises *rRNA 16S* em larga escala, não podem ser classificadas a nível de gênero. Convencionalmente, para realizar a caracterização de uma espécie, é necessário seu isolamento por algum método de cultura, para então poder-se realizar análises fenológicas e moleculares. Este é um desafio o qual não é possível resolver com estudos baseados

somente em sequenciamento de porções do *rRNA 16S* e nem com abordagens de metagenômica. Porém, com os avanços no preparo de bibliotecas de sequenciamento, a partir de uma única célula, será possível realizar o sequenciamento completo de microorganismos não cultiváveis. Com isso, o sequenciamento de *rRNA 16S* em larga escala, associados com estudos funcionais de ambientes utilizando metagenômica e caracterização de novas espécies não cultiváveis usando o sequenciamento completo de uma única célula, são as ferramentas necessárias para que a microbiologia deixe de ser considerada “a matéria negra da biologia”.

REFERÊNCIAS

- Allison, S.D. & Martiny, J.B.H. (2008) Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105 Suppl**, 11512–11519.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**, 403–10.
- Arhonditsis, G.B., Adams-Vanharn, B. a., Nielsen, L., Stow, C. a. & Reckhow, K.H. (2006) Evaluation of the current state of mechanistic aquatic biogeochemical modeling: Citation analysis and future perspectives. *Environmental Science and Technology*, **40**, 6547–6554.
- Arnell, N. (1999) Climate change and global water resources. *Global Environmental Change*, **9**, S31–S49.
- Arnell, N.W., van Vuuren, D.P. & Isaac, M. (2011) The implications of climate policy for the impacts of climate change on global water resources. *Global Environmental Change*, **4**, 1–12.
- Azam, F. & Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature reviews. Microbiology*, **5**, 782–791.
- Azizullah, A., Khattak, M.N.K., Richter, P. & Häder, D.-P. (2011) Water pollution in Pakistan and its impact on public health--a review. *Environment international*, **37**, 479–97.
- Bertelli, C. & Greub, G. (2013) Rapid bacterial genome sequencing: Methods and applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, **19**, 803–813.
- Blainey, P.C. (2013) The future is now: Single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 407–427.
- Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M.T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., Sogin, M.L., Rosenberg, M., Maguire, M.E., Belkin, S., Oren, A. & Béjà, O. (2010) Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *The ISME journal*, **4**, 399–407.
- Bowers, K.J., Mesbah, N.M. & Wiegel, J. (2009) Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline systems*, **5**, 9.
- Bowers, K.J. & Wiegel, J. (2011) Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: A mini-review. *Extremophiles*, **15**, 119–128.

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. & Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, **64**, 807–38.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. & Knight, R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N. & Knight, R. (2011a) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108 Suppl** , 4516–22.
- Caporaso, J.G., Paszkiewicz, K., Field, D., Knight, R. & Gilbert, J.A. (2011b) The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *The ISME journal*.
- Chao, A. & Lee, S. (1992) Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American statistical Association*, **87**, 210–217.
- Cottrell, M.T., Waidner, L.A., Yu, L. & Kirchman, D.L. (2005) Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environmental microbiology*, **7**, 1883–95.
- Crump, B.C., Amaral-Zettler, L.A. & Kling, G.W. (2012) Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. *The ISME Journal*, **6**, 1629–1639.
- Crump, B.C., Peterson, B.J., Raymond, P. a, Amon, R.M.W., Rinehart, A., McClelland, J.W. & Holmes, R.M. (2009) Circumpolar synchrony in big river bacterioplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 21208–21212.
- Debroas, D., Humbert, J.-F., Enault, F., Bronner, G., Faubladiere, M. & Cornillot, E. (2009) Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget--France). *Environmental microbiology*, **11**, 2412–24.
- Djikeng, A., Kuzmickas, R., Anderson, N.G. & Spiro, D.J. (2009) Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PloS one*, **4**, e7264.
- Duan, Y., Zhu, Z., Cai, K., Tan, X. & Lu, X. (2011) De novo Biosynthesis of Biodiesel by *Escherichia coli* in Optimized Fed-Batch Cultivation (ed A Driessen). *PLoS ONE*, **6**, e20265.
- Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, **26**, 2460–2461.

- Ekkers, D.M., Cretoiu, M.S., Kielak, A.M. & Van Elsas, J.D. (2012) The great screen anomaly—a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**, 1005–1020.
- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Payn, R. a, Schmid, M., Stern, L. a, Schleifer, K.H. & Lee, N.M. (2010) Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *The ISME journal*, **4**, 98–110.
- Faith, D.P. (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, **61**, 1–10.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T. & Delong, E.F. (2008) The microbial engines that drive Earth’s biogeochemical cycles. *Science (New York, N.Y.)*, **320**, 1034–1039.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. (2012) CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, **28**, 3150–3152.
- Gibbons, S.M., Caporaso, J.G., Pirrung, M., Field, D., Knight, R. & Gilbert, J. a. (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 4651–4655.
- Gilbert, J. a, Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P.J., Huse, S. & Joint, I. (2009) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental microbiology*, **11**, 3132–9.
- Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A.C., Knight, R., Joint, I., Somerfield, P., Fuhrman, J.A. & Field, D. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, **6**, 298–308.
- Giovannoni, S.J. & Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, **437**, 343–348.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J. & Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, **5**, 1571–1579.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D’Hondt, S. & Jørgensen, B.B. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 2815–2820.

- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D. a, Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W., Kirchman, D.L., Weinbauer, M.G., Luo, T., Chen, F. & Azam, F. (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature reviews. Microbiology*, **8**, 593–599.
- Jones, S.E., Cadkin, T. a., Newton, R.J. & McMahon, K.D. (2012) Spatial and temporal scales of aquatic bacterial beta diversity. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 1–10.
- Köser, C.U., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Gillespie, S.H., Brown, N.M., Farrington, M., Holden, M.T.G., Dougan, G., Bentley, S.D., Parkhill, J. & Peacock, S.J. (2012) Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology. *PLoS Pathogens*, **8**.
- Krause, E., Wichels, A., Giménez, L., Lunau, M., Schilhabel, M.B. & Gerdtts, G. (2012) Small Changes in pH Have Direct Effects on Marine Bacterial Community Composition: A Microcosm Approach. *PLoS ONE*, **7**.
- Li, X. & Qin, L. (2005) Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends in biotechnology*, **23**, 539–43.
- Lindeman, R.L. (1942) The trophic dynamics aspect of ecology. *Ecology*, **23**, 399–418.
- Lorenz, P. & Eck, J. (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nature reviews. Microbiology*, **3**, 510–516.
- Lozupone, C. & Knight, R. (2005) UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 8228–8235.
- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J. & Knight, R. (2011) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, **5**, 169–172.
- Martins, L.F., Antunes, L.P., Pascon, R.C., de Oliveira, J.C.F., Digiampietri, L. a., Barbosa, D., Peixoto, B.M., Vallim, M. a., Viana-Niero, C., Ostroski, E.H., Telles, G.P., Dias, Z., da Cruz, J.B., Juliano, L., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A.M. & Setubal, J.C. (2013) Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. *PLoS ONE*, **8**.
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J. a, Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V.H. & Staley, J.T. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature reviews. Microbiology*, **4**, 102–112.

- McDonald, R.I., Green, P., Balk, D., Fekete, B.M., Revenga, C., Todd, M. & Montgomery, M. (2011) Urban growth, climate change, and freshwater availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–6.
- McGuire, K.L. & Treseder, K.K. (2010) Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 529–535.
- McMahon, K.D., Martin, H.G. & Hugenholtz, P. (2007) Integrating ecology into biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**, 287–292.
- Nagata, T., Tamburini, C., Aristegui, J., Baltar, F., Bochdansky, A.B., Fonda-Umani, S., Fukuda, H., Gogou, A., Hansell, D. a. & Hansman, R.L. (2010) Emerging concepts on microbial processes in the bathypelagic ocean – ecology, biogeochemistry, and genomics. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **57**, 1519–1536.
- Nawrocki, E.P. & Eddy, S.R. (2013) Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, **29**, 2933–2935.
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D. & Bertilsson, S. (2011) *A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria*.
- Nyyssönen, M., Hultman, J., Ahonen, L., Kukkonen, I., Paulin, L., Laine, P., Itävaara, M. & Auvinen, P. (2014) Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *The ISME journal*, **8**, 126–38.
- Offre, P., Spang, A. & Schleper, C. (2013) Archaea in biogeochemical cycles. *Annual review of microbiology*, **67**, 437–57.
- De Oliveira, L.F.V. & Margis, R. (2015) The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. *Plos One*, **10**, e0120608.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A. & Itabashi, H. (2005) The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **69**, 499–506.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science (New York, N.Y.)*, **276**, 734–740.
- Pahl-Wostl, C. (2006) Transitions towards adaptive management of water facing climate and global change. *Water Resources Management*, **21**, 49–62.
- Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D. & López-García, P. (2010) Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *The ISME journal*, **5**, 285–304.

- Rani, A., Porwal, S., Sharma, R., Kapley, A., Purohit, H.J. & Kalia, V.C. (2008) Assessment of microbial diversity in effluent treatment plants by culture dependent and culture independent approaches. *Bioresource technology*, **99**, 7098–107.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, L., Griffi, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Michael, J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Treuren, W. Van, William, a, Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., Kau, A.L., Griffin, N.W. & Muehlbauer, M.J. (2013) Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice Gut Microbiota from Twins Metabolism in Mice. , **341**.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J. a., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.C.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Neilson, K., Friedman, R., Frazier, M. & Venter, J.C.E. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biology*, **5**, 0398–0431.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, a, Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H. a, Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100 . *Science*, **287**, 1770–1774.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. & Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**, 687–695.
- Sauvadet, A.-L., Gobet, A. & Guillou, L. (2010) Comparative analysis between protist communities from the deep-sea pelagic ecosystem and specific deep hydrothermal habitats. *Environmental microbiology*, **12**, 2946–64.
- Schloss, P.D. & Handelsman, J. (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 303–310.
- Shade, A., Read, J.S., Youngblut, N.D., Fierer, N., Knight, R., Kratz, T.K., Lottig, N.R., Roden, E.E., Stanley, E.H., Stombaugh, J., Whitaker, R.J., Wu, C.H. & McMahon, K.D. (2012) Lake microbial communities are resilient after a whole-ecosystem disturbance. *The ISME Journal*.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J. a, Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. & Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored

- “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 12115–20.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 5261–5267.
- Wang, Y. & Qian, P.-Y. (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one*, **4**, e7401.
- Warnecke, F. & Hess, M. (2009) A perspective: Metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, **142**, 91–95.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6578–6583.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution Background. *Microbiology*, **51**, 221–271.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4576–4579.
- Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E.C., Li, W.-X. & Ding, S.-W. (2010) Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 1606–11.
- Xie, W., Wang, F., Guo, L., Chen, Z., Sievert, S.M., Meng, J., Huang, G., Li, Y., Yan, Q., Wu, S., Wang, X., Chen, S., He, G., Xiao, X. & Xu, A. (2010) Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *The ISME journal*, **5**, 414–426.
- Yooseph, S., Nealson, K.H., Rusch, D.B., McCrow, J.P., Dupont, C.L., Kim, M., Johnson, J., Montgomery, R., Ferriera, S., Beeson, K., Williamson, S.J., Tovchigrechko, A., Allen, A.E., Zeigler, L.A., Sutton, G., Eisenstadt, E., Rogers, Y.-H., Friedman, R., Frazier, M. & Venter, J.C. (2010) Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature*, **468**, 60–66.
- Zehr, J.P. & Ward, B.B. (2002) Nitrogen Cycling in the Ocean : New Perspectives on Processes and Paradigms MINIREVIEW Nitrogen Cycling in the Ocean : New Perspectives on Processes and Paradigms. *Applied and environmental microbiology*, **68**, 1015–1024.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L. a., Fuhrman, J. a., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Martiny, J.B.H., Sogin, M., Boetius, A. & Ramette, A. (2011) Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS ONE*, **6**, 1–11.

ANEXOS:

Anexo 1: Outros artigos publicados. Artigo publicado como primeiro autor.

Citação:

de Oliveira LFV, Christoff AP, de Lima JC, de Ross BC, Sachetto-Martins G, Margis-Pinheiro M and Margis R (2014) The Wall-associated Kinase gene family in rice genomes. *Plant Sci* 229:181–92. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.007

Anexo 2: Outros artigos publicados. Artigo publicado como primeiro autor.

Citação:

de Oliveira LFV, Christoff AP and Margis R (2013) isomiRID: a framework to identify microRNA isoforms. *Bioinformatics* 29:2521. doi: 10.1093/bioinformatics/btt424

Anexo 3: Outros artigos publicados. Artigo publicado em colaboração.

Citação:

Arenhart R, Bai Y, de Oliveira L, Neto L, Schunemann M, Maraschin F, Mariath J, Silverio A, Sachetto-Martins G, Margis R et al. (2014) New Insights into Aluminum Tolerance in Rice: The ASR5 Protein Binds the STAR1 Promoter and Other Aluminum-Responsive Genes. *Molecular Plant* 7:709–721. doi: 10.1093/mp/sst160

Anexo 4: Outros artigos publicados. Artigo publicado em colaboração.

Citação:

Galli V, Guzman F, de Oliveira LF, Loss-Morais G, Körbes AP, Silva SD, Margis-Pinheiro MM and Margis R (2014) Identifying microRNAs and transcript targets in *Jatropha* seeds. PLoS ONE 9:e83727. doi: 10.1371/journal.pone.0083727

Anexo 5: Outros artigos publicados. Artigo publicado em colaboração.

Citação:

Abreu-Neto J, Turchetto-Zolet A, Oliveira L, Zanettini M and Margis-Pinheiro M (2013)
Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a
family of proteins exclusive to plants. FEBS Journal 280:1604. doi:
10.1111/febs.12159

Anexo 6: Outros artigos publicados. Artigo publicado em colaboração.

Citação

Körbes A, Machado R, Guzman F, Almerão M, Oliveira L, Loss-Morais G, Turchetto-Zolet A, Cagliari A, Maraschin F and Margis-Pinheiro M (2012) Identifying Conserved and Novel MicroRNAs in Developing Seeds of Brassica napus Using Deep Sequencing. PloS one 7:e50663. doi: 10.1371/journal.pone.0050663

Anexo 7: Outros artigos publicados. Artigo publicado em colaboração.

Citação:

Molina L, Cordenonsi G, Loss G, Oliveira L, Carvalho K, Kulcheski F and Margis R
(2012) Metatranscriptomic analysis of small RNAs present in soybean deep
sequencing libraries. Genet Mol Biol 35:292. doi: 10.1590/S1415-
47572012000200010

Anexo 8: Outros artigos submetidos para publicação em colaboração.

Titulo: Deep RNAseq reveals cold tolerance mechanisms of *indica* rice plants during early vegetative stage

Autores: Raul Antonio Sperotto; Janete Mariza Adamski; Denise Cargnelutti; Luiz Felipe Valter de Oliveira; Andressa Dametto; Felipe Klein Ricachenevsky; Renata Pereira da Cruz; Rinaldo Pires dos Santos; Leila Picolli da Silva; Rogério Margis; Janette Palma Fett

Periódico: Plant Science

Anexo 9: Outros artigos submetidos para publicação em colaboração.

Título: ASR5 is involved in the regulation of miRNA expression in rice

Autores: Bucker-Neto, Lauro; Arenhart, Rafael; de Oliveira, Luiz Felipe; de Lima, Júlio Cesar; Margis, Rogério; Bodanese Zanettini, Maria Helena; Margis-Pinheiro, Marcia

Periódico: Plant Cell Reports

Anexo 10: Outros artigos submetidos para publicação em colaboração.

Titulo: Deep RNAseq analysis in two contrasting *indica* rice genotypes reveals cold tolerance mechanisms in germinating seeds

Autores: Andressa Dametto; Raul Antonio Sperotto; Janete Mariza Adamski; Édina Aparecida dos Reis Blasi; Tatiana de Freitas Terra; Denise Cargnelutti; Luiz Felipe Valter de Oliveira; Felipe Klein Ricachenevsky; Renata Pereira da Cruz; Rogério Margis; Janette Palma Fett

Periódico: Planta

Anexo 11: Outros artigos submetidos para publicação em colaboração.

Titulo: Unusual RNA plant virus integration in the soybean genome leads to the production of small RNAs

Autores: Guilherme Cordenonsi da Fonseca, Luiz Felipe Valter de Oliveira, Guilherme Loss de Moraes, Ricardo V Abdelnor, Alexandre Nepomuceno, Peter M Waterhouse, Laurent Farinelli, Rogerio Margis

Periódico: BMC Genome Biology

Anexo 11: Outros artigos submetidos para publicação em colaboração.

Título: Novel and conserved microRNAs in soybean floral whorls

Autores: Franceli R Kulcheski; Lorrayne G Molina; Guilherme C da Fonseca; Guilherme L de Moraes; Luiz Felipe V de Oliveira; Rogerio Margis

Periódico: GENE