



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Jaimet Fernando Bucheli Fuelantala

Caracterização das comunidades bacterianas presentes em diferentes sistemas de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando sequenciamento de alto rendimento

Florianópolis

2021

Jaimet Fernando Bucheli Fuelantala

Caracterização das comunidades bacterianas presentes em diferentes sistemas de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando sequenciamento de alto rendimento

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Coorientador: Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fuelantala, Jaimet Fernando Bucheli

Caracterização das comunidades bacterianas presentes em diferentes sistemas de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando sequenciamento de alto rendimento / Jaimet Fernando Bucheli Fuelantala ; orientador, Roberto Bianchini Derner, coorientador, José Luiz Pedreira Mouriño, 2021.

49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Metagenômica. 3. RNAr16S. 4. Amplicons. 5. NGS. I. Derner, Roberto Bianchini. II. Mouriño, José Luiz Pedreira . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Jaimet Fernando Bucheli Fuelantala

Caracterização das comunidades bacterianas presentes em diferentes sistemas de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando sequenciamento de alto rendimento

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Universidade federal de Santa Catarina

Eng. de Aquicultura Gabriella do Valle Pereira, Dra.
Spargos. Lda.

Profa. Maria Cecilia Miotto. Dra
Centro Universitário Leonardo da Vinci

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Orientador

Florianópolis,
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a toda minha família, pelo incentivo e ânimos dados desde o início da minha vida acadêmica, por se envolverem profundamente nessa caminhada. Eterna gratidão porque nunca faltou sua força nos momentos difíceis.

A meus irmãos brasileiros e colombianos, que sempre torceram por mim. Por todas as conversas, histórias, conselhos, canções, paródias, debates, surpresas, alegrias, tragédias, shows, sustos e viagens que vivemos nesses anos de constante aprendizado.

Pelas amizades que nasceram durante o mestrado, pelo tempo compartilhado e pela companhia desde o primeiro dia até o dia final.

Aos membros da equipe Laboratório de Cultivo de Algas LCA, por toda a ajuda e parceria tanto dentro e quanto fora do laboratório.

Ao Orientador, ao Coorientador e ao Biólogo Rafael Garcia Lopes, pela orientação, ideias, ensinamentos, conselhos e apoio no desenvolvimento desse trabalho de pesquisa e na vida acadêmica.

À Secretaria do PPGAQI pela paciência, compreensão e atenção oferecidas durante o processo acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de estudos.

RESUMO

Os estudos das comunidades bacterianas associadas às culturas de microalgas ainda não são bem compreendidos em relação às funções benéficas ou prejudiciais destes micro-organismos nos ambientes de cultivo. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi a caracterização das comunidades bacterianas associadas a diferentes sistemas de cultivo na microalga *Scenedesmus obliquus*. Para tal fim, foi desenvolvido um cultivo sequencial em três sistemas diferentes com base nos sistemas de cultivo do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA/UFSC): Sistema de Cultivo de Bancada (SCB); Sistema Fotobiorreator tipo *flat-panel* (SFFP) considerados sistemas intensivos e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA), considerado um sistema superintensivo. As culturas foram monitoradas diariamente em relação aos parâmetros de crescimento (densidade celular e biomassa) e as amostras foram coletadas, em cada sistema de cultivo, na fase de crescimento exponencial para a caracterização das comunidades bacterianas utilizando a análise metagenômica de sequenciamento de alto rendimento. Foram produzidas 195.177 leituras, permitindo a identificação de 72 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) em uma faixa de 25.000 a 30.000 leituras por réplica técnica nos três sistemas de cultivo. No agrupamento das comunidades bacterianas foram encontrados 3 Filos, 6 Classes, 28 Famílias e 35 Espécies. As espécies *Brevundimonas aurantiaca* e *Porphyrobacter neustonensis* apresentaram uma abundância relativa mais alta em relação a outras espécies encontradas como *Aquimonas voraii*, *Hydrogenophaga intermedia*, *Phenylobacterium falsum*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseoglobus frigidaquae* e *Rhizobium rosettiforman*; as anteriores espécies estiveram presentes em todos os sistemas de cultivo formando uma possível comunidade “core”. As comunidades bacterianas associadas a diferentes sistemas de cultivo da microalga *S. obliquus* mostraram um aumento na riqueza e diversidade de espécies no sistema superintensivo e intensivo, sendo que o SFFP apresentou uma maior riqueza e diversidade das comunidades bacterianas.

Palavras chave: Aquicultura; Metagenômica; RNAr16S, *Amplicons*; NGS; Chlorophyceae.

ABSTRACT

Studies of bacterial communities associated with microalgae cultures are still not well understood in terms of beneficial or harmful functions of these microorganisms in culture environments. In this sense, the objective of this work was to characterize the bacterial communities associated with different culture systems in the microalgae *Scenedesmus obliquus*. To this end, sequential cultivation was developed in three different systems based on the cultivation systems of the Algae Cultivation Laboratory (LCA/UFSC): Bench Cultivation System (SCB); Flat-panel Photobioreactor System (SFFP) considered as intensive systems and Laminar Microalgae Cultivation System (SLCA), considered as super-intensive systems. Cultures were monitored daily for growth parameters (cell density and biomass) and samples were collected from each culture system in the exponential growth phase for characterization of bacterial communities using high-throughput sequencing metagenomic analysis. 195,177 reads were produced, allowing the identification of 72 Operational Taxonomic Units (UTOs) in a range of 25,000 to 30,000 reads per technical replication in the three culture systems. Within the grouping of bacterial communities, 3 Phyla, 6 Classes, 28 Families, and 35 species were found. *Brevundimonas aurantiaca* and *Porphyrobacter neustonensis* had a higher relative abundance compared to other species found such as *Aquimonas voraii*, *Hydrogenophaga intermedia*, *Phenylobacterium falsum*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseoglobus frigidaquae*, and *Rhizobium rosettiforman*; these species were present in all cultivation systems forming a possible “core” community. Bacterial communities associated with different cultivation systems of the microalgae *S. obliquus* showed an increase in species richness and diversity in superintensive and intensive system, and the SFFP presented a greater richness and diversity of these bacterial communities.

Keywords: Aquaculture; Metagenomics; RNAr16S; Amplicons; NGS; Chlorophyceae.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema de endossimbioses sucessivas que deram origem às microalgas | 12 |
| Figura 2 - Fotografia de células de <i>Scenedesmus obliquus</i> | 14 |
| Figura 3 - Fluxo de cultivo da microalga <i>S. obliquus</i> com relação à metodologia proposta para a realização do experimento | 25 |
| Figura 4 - Composição taxonômica (Filo e Classe) das comunidades bacterianas presentes nas culturas de <i>S. obliquus</i> no Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), no Sistema Fotobiorreator tipo <i>flat panel</i> (SFFP) e no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA). | 30 |
| Figura 5 - Abundância relativa ao nível de Família das comunidades bacterianas registradas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo <i>flat panel</i> (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA) | 31 |
| Figura 6 - Diagrama de Venn indicando a comunidade bacteriana core e comunidades únicas presente nos diferentes sistemas de cultivo da microalga <i>S. obliquus</i> | 34 |
| Figura 7 - <i>Heatmap</i> espécies. Abundância relativa de espécies bacterianas associadas à cultura de microalgas .Classificando UTOs como abundância alta verde, abundância média preto, baixa abundância, vermelho e vinho (0%) | 35 |
| Figura 8 - Análise de similaridade Bray-Curtis entre os três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB); Sistema Fotobiorreator tipo <i>flat panel</i> (SFFP); e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA)..... | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Estudos onde o cocultivo corrobora benefícios no crescimento nas culturas algais. | 16 |
| Tabela 2 - Características e condições ambientais em cada sistema de cultivo experimental de <i>S. obliquus</i> . | 24 |
| Tabela 3 - Sequência de iniciadores usados para o sequenciamento | 27 |
| Tabela 4 - Métricas de Diversidade Alfa das comunidades bacterianas das culturas de <i>S. obliquus</i> desenvolvidas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo <i>flat panel</i> (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA). | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| HTS: | Sequenciamento de alto rendimento; do inglês <i>high throughput sequencing</i> |
| LCA: | laboratório de cultivo de algas |
| PCR: | reação de cadeia de polimerase; do inglês <i>polymerase reaction chain</i> |
| qPCR: | PCR quantitativo em tempo real |
| RNAr: | ácido ribonucleico ribossomal |
| SCB: | Sistema de Cultivo de Bancada |
| SFFP: | Sistema Fotobioreator tipo <i>Flat Panel</i> |
| SLCA: | Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas |
| UTOs: | unidades taxonômicas operacionais; do inglês OTUs <i>operational taxonomic unit</i> |

SUMÁRIO

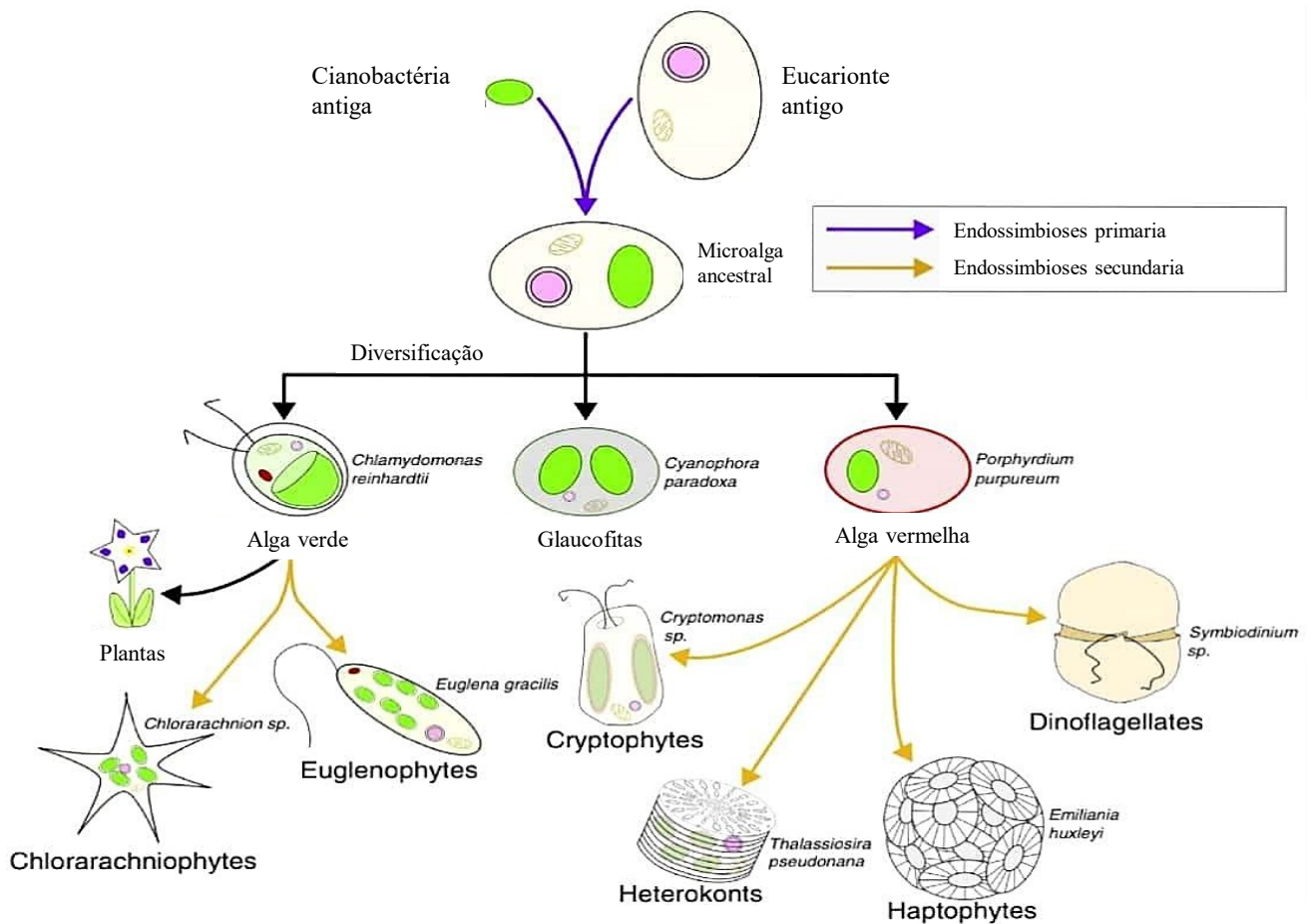
| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 | <i>Scenedesmus obliquus</i> | 13 |
| 1.2 | INTERAÇÕES ENTRE MICROALGAS E BACTÉRIAS..... | 14 |
| 1.3 | CARATERÍSTICAS FAVORÁVEIS OFERECIDAS POR BACTÉRIAS NO CULTIVO DE MICROALGAS | 16 |
| 1.3.1 | Crescimento | 16 |
| 1.3.2 | Aclimação da salinidade e tolerância à temperatura | 17 |
| 1.3.3 | Fornecimento de nutrientes | 18 |
| 1.3.4 | Macronutrientes | 18 |
| 1.4 | IMPORTÂNCIA DO 16S RNA _r NAS CARACTERIZAÇÕES BACTERIANAS.. | 19 |
| 1.5 | SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO | 20 |
| 1.6 | OBJETIVO GERAL | 21 |
| 1.6.1 | Objetivos Específicos | 21 |
| 2 | ARTIGO CIENTIFICO | 22 |
| 2.1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 2.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 2.2.1 | Material biológico e condições experimentais | 24 |
| 2.2.2 | Sequenciamento de alto rendimento | 26 |
| 2.2.2.1 | <i>Extração e amplificação do DNA Bacteriano</i> | 26 |
| 2.2.2.2 | <i>Amplificação por PCR</i> | 27 |
| 2.2.2.3 | <i>Identificação do DNA bacteriano</i> | 27 |
| 2.2.3 | Determinação da Riqueza, Diversidade e Dominância | 28 |
| 2.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 2.3.1 | Biomassa | 28 |
| 2.3.2 | Descrição da riqueza, diversidade e dominância das comunidades bacterianas presentes nos sistemas de cultivo da microalga <i>S. obliquus</i> | 29 |
| 2.4 | CONCLUSÕES | 38 |
| | REFERÊNCIAS..... | 38 |
| | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 43 |
| | REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO | 44 |

APÊNDICE A – Abundância relativa das espécies encontradas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo flat panel (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA) 49

1 INTRODUÇÃO

O termo microalgas é empregado para denominar um grupo de organismos unicelulares, fotoautotróficos em sua maioria e que reúnem outras características em comum (SOUTH; WHITTICK, 1987). São encontradas em diversos ambientes úmidos e compreendem um grande número de táxons constituídos em um grupo de organismos polifiléticos que filogeneticamente tem uma única unificação característica sendo a presença de plastídios, derivados inicialmente de um evento endossimbiótico (Figura 1)

Figura 1 - Esquema de endossimbioses sucessivas que deram origem às microalgas.



Fonte: COOPER; SMITH, (2015).

Entre um antigo micro-organismos eucarionte com uma cianobactéria fotossintética (COOPER; SMITH, 2015) conseqüentemente, pode se aludir como uma hipótese à fonte final da fotossíntese em eucariontes, refere-se à captação e retenção de uma cianobactéria é um dos

motivos que evolutivamente têm sido associados as microalgas e outros micro-organismos como as bactérias jazem próximos aos ambientes naturais e artificiais (KEELING, 2013).

As microalgas estão envolvidas em várias cadeias tróficas aquáticas além de estar envolvidas na ciclagem ou reciclagem de nutrientes e na transferência de energia em ecossistemas naturais e artificiais (MURDOCK; WETZEL, 2009). Nos últimos anos, a produção das microalgas têm crescido rapidamente, principalmente em relação à alimentação de organismos aquáticos na aquicultura devido ao seu elevado valor nutricional, também como potenciais aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, setores de horticultura (WANG *et al.*, 2015^a). Entre outras finalidades, por exemplo, as microalgas são notoriamente conhecidas como agentes produtores de pigmentos específicos e como micro-organismos que contribuem no tratamento biológico para a remoção de amônia, fósforo e metais pesados de águas residuais (KUMAR *et al.*, 2015)

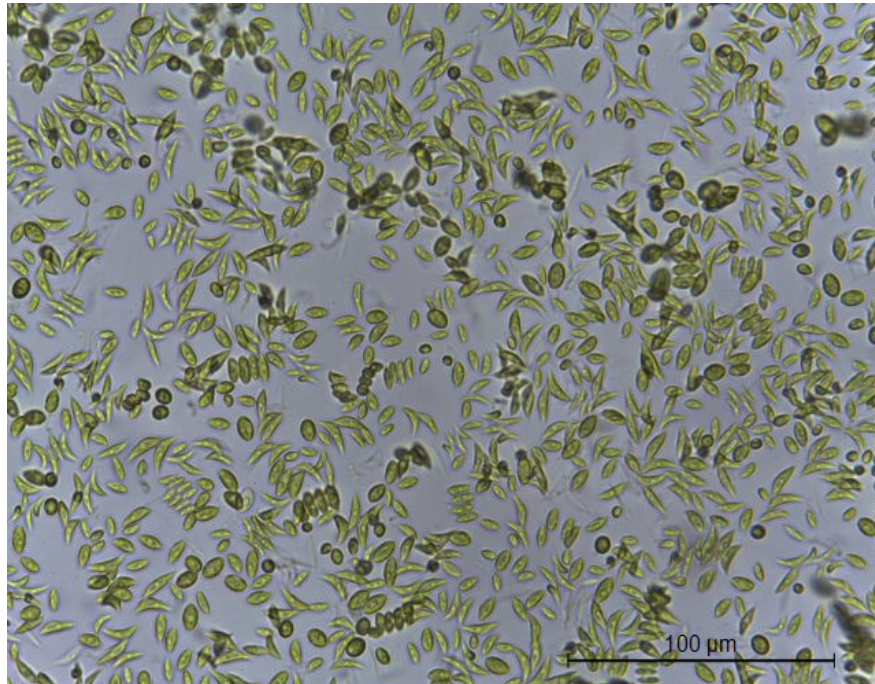
1.1 *Scenedesmus obliquus*

O gênero *Scenedesmus* pertencente a classe Clorofíceas é representado por microalgas de água doce e marinha, espécies de dito gênero podem apresentar algumas características de interesse biotecnológico e de cultivo, por exemplo: alta produtividade lipídica, alto rendimento de biomassa na fase estacionária (OLIVEIRA *et al.*, 2020^a).

Além do mais, a espécie *S. obliquus* também contém elevadas quantidades de aminoácidos essenciais, teores proteicos e minerais que podem ser usados como complemento de alimentos vivos na aquicultura e nos sistemas biológicos de tratamento de água (TOYUB *et al.*, 2008).

Particularmente, *S. obliquus* (Figura 2), é uma espécie conhecida devido às suas características de rusticidade. Foi relatado por LI, (2011) como ter a capacidade de crescer rapidamente com alto teor de nutrientes, tolerância ao calor e também adequada para cultivo em clima tropical. Tendo, potencial para a produção de biocombustíveis, fixação de CO₂ e biorremediação (ÁLVAREZ-DÍAZ *et al.*, 2015; MANDAL; MALLICK, 2009). Em virtude das características referidas, no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) são desenvolvidos estudos sobre essa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2020^a; OLIVEIRA *et al.*, 2020^b; VENANCIO *et al.*, 2020).

Figura 2 - Fotografia de células de *Scenedesmus obliquus*.



Fonte: Laboratório de Cultivo de Algas (2020).

1.2 INTERAÇÕES ENTRE MICROALGAS E BACTÉRIAS

Nas culturas monoalgais (uma só espécie de microalga), tanto em laboratório quanto em escala industrial, gerar condições axênicas é extremamente difícil de alcançar e manter, portanto, as microalgas são geralmente cultivadas em conjunto com bactérias e outros micro-organismos associados. Nesse caso, as bactérias podem ser derivadas das comunidades bacterianas associadas diretamente com a microalga, sistema de cultivo ou de uma fonte externa, como: soluções de nutrientes, água e a própria interface ambiente/sistema de cultivo (CARNEY; SORENSEN, 2016; DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007).

A maioria das microalgas vive em simbiose com múltiplos micro-organismos associados ao longo de seu ciclo de vida (DITTAMI, S. M.; EVEILLARD, D.; TONON, 2014). Em muitos casos, tentativas de remover bactérias ou fungos das culturas de microalgas em escala laboratorial e industrial não são bem sucedidas, porém, quando tais tentativas são bem-sucedidas, a microbiota algal purificada geralmente exibe crescimento mais baixo ou apresenta anomalias nos fenótipos, em comparação às cepas isentas do processo de axenização. O que indica que uma possível associação entre as microalgas e diferentes micro-organismos é importante para seu desenvolvimento (HOM *et al.*, 2015).

Estudos indicam que as microalgas liberam matéria orgânica dissolvida ou moléculas sinalizadoras para nutrir as comunidades bacterianas específicas na ficosfera (*phycosphere*)

(AMIN; PARKER; ARMBRUST, 2012) e que essas interações estreitas na ficosfera influenciaram a evolução das microalgas de várias maneiras.

Por exemplo, *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira pseudonana* adquiriram centenas de genes das bactérias associadas, tais como: *Aureococcus anophagefferens*, *Planctomyces maris* DSM 8797, *Blastopirellula marina* DSM 3645 dentre outras, que acredita-se estar envolvidos na utilização do nitrogênio e do carbono orgânico, na montagem da parede celular, na recombinação do DNA e no ciclo de ornitina-ureia, e que parece que tais interações vêm ocorrendo durante mais de 200 milhões de anos (BOWLER *et al.*, 2008).

Por outro lado, as bactérias também sintetizam compostos importantes para estimulação do crescimento microalgal, germinação de esporos, morfogênese e resistência a patógenos (AMIN; PARKER; ARMBRUST, 2012; RAMANAN *et al.*, 2016). Esses compostos incluem micronutrientes, sideróforos, estimulantes de crescimento e antibióticos (AMIN *et al.*, 2009; BRUHN; GRAM; BELAS, 2007; DANCHIN; BRAHAM, 2017; WAHL *et al.*, 2012). Além do mais, determinados micro-organismos simbióticos ajudam suas algas hospedeiras a lidar com as mudanças nas condições ambientais (DITTAMI *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2013).

Por conseguinte, a caracterização da diversidade bacteriana vem sendo estudada nos últimos anos em cultivos de microalgas marinhas e dulcícolas. A dominância da diversidade bacteriana ocorre de acordo com as características e propriedades dos sistemas de cultivo, estação do ano, meios de cultura, local geográfico de isolamento, entre outros fatores (PIAMPIANO *et al.*, 2019). Pesquisas feitas com diferentes gêneros de microalgas em distintos sistemas de cultivo, revelam a dominância dos seguintes Filos bacterianos: Proteobactéria, em um sistema de cultivo tipo raceway com *Nannochloropsis salina*; Bacteroidetes, em um sistema de fotobiorreator; Proteobactéria e Firmicutes, em um sistema fechado de laboratório com *Botryococcus braunii*. (CARNEY; LANE, 2014; FULBRIGHT *et al.*, 2018; SAMBLES *et al.*, 2017). Em outro estudo realizado com uma mistura de *Chlorella vulgaris* e *S. obliquus* (KROHN-MOLT *et al.*, 2013), os Filos Proteobactéria e Bacteroidetes foram aproximadamente 75% da comunidade bacteriana total num sistema de biofilme. Particularmente, o Filo Proteobactéria é encontrado formando associação com as microalgas de cultivo independentemente do gênero e da água doce ou marinha.

1.3 CARACTERÍSTICAS FAVORÁVEIS OFERECIDAS POR BACTÉRIAS NO CULTIVO DE MICROALGAS

1.3.1 Crescimento

Em relação à maioria das bactérias detectadas nos sistemas de cultivo de microalgas, ainda não é completamente compreendido como acontecem as interações microalga-bactéria. Observações recentes demonstraram que tais interações mutualísticas são predominantes (SEYMOUR *et al.*, 2017). Múltiplas bactérias têm sido testadas em cocultivo, para avaliar os efeitos sobre o crescimento das microalgas (BIONDI *et al.*, 2017; LE CHEVANTON *et al.*, 2013), conforme apresentado na Tabela 1 alguns estudos feitos com diferentes gêneros de microalgas.

Tabela 1 - Estudos onde o cocultivo corrobora benefícios no crescimento nas culturas algais. (continua)

| Microalga | Bactéria associada | Efeito | Metodologia para cultivo axênico | Referência |
|---|--|---|--|----------------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Bacillus pumilus</i> | Densidade final das células aumentou em 150% em meio sem nitrogênio | Método não mencionado | (HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp, <i>Hyphomonas</i> sp, <i>Sphingomonas</i> sp. | A densidade celular aumentou em mais de 100% | Ultra-som, classificador de células ativadas por fluorescência e <i>micropicking</i> | (CHO <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Rhizobium</i> sp. | A contagem de células aumentou 72% e a taxa de crescimento aumentou 11% | Não axênico | (KIM <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Várias bactérias de águas domésticas | Maior taxa de crescimento | Não axênico | (LAKANIEMI <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | <i>Brevundimonas</i> sp. | A densidade das células algais aumentou três vezes após sete dias | Estrias seriais | (PARK <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> IAM C- 212co | <i>Microbactéria tricotecenolíti</i> | Taxa de crescimento aumentou 16% | Estreptomicina, gentamicina, penicilina G, vancomicina epimaricina | (WATANABE <i>et al.</i> , 2005) |

| Microalga | Bactéria associada | Efeito | Metodologia para cultivo axênico | Referência |
|---|---|---|---|-------------------------------------|
| <i>Dunaliella</i> sp. SAG 19.3. | <i>Alteromonas</i> sp. e <i>Muricauda</i> sp | Aumento na biomassa por 22% e 26% | Ampicilina, gentamicina, canamicina e neomicina | (LE CHEVANTON <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>Botryococcus braunii</i> | BOTRYCO-2 | Crescimento mais rápido e biomassa aumentado em 80% | Ampicilina | (TANABE <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Lobomonas rostrata</i> | <i>Mesorhizob loti</i> | Fornecendo vitamina B 12 | Método não mencionado | (GRANT <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Scrippsiella trochoidea</i> | <i>Marinobacter</i> sp. cepa DG879A | Densidade celular aumentou mais de 6% | Estreptomicina | (AMIN <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Thalassiosira rotula</i> . | <i>Roseobacter</i> sp. e <i>Hyphomonas</i> sp | Início precoce do crescimento e números mais altos de células algais. | Método não mencionado | (GROSSART; SIMON, 2007) |
| <i>Phaeodactylum tricorutum</i> Utex646 | <i>AlphaProteobactéria</i> sp. Cepa 29 | A densidade celular aumentou até 55% | Método não mencionado | (BRUCKNER <i>et al.</i> , 2011) |

Adaptado de LIAN *et al.* (2018).

1.3.2 Aclimação da salinidade e tolerância à temperatura

Além dos papéis ecofisiológicos mencionados anteriormente, as bactérias podem apresentar um reservatório gênico, para a evolução e adaptação das microalgas a diferentes condições ambientais por meio de uma via gênica de transferência horizontal (BOWLER *et al.*, 2008).

Por exemplo, a cepa SENEW3 da microalga *Picochlorum* sp. (Division Clorofita) tem uma ampla tolerância a grandes flutuações na salinidade de pelo menos 35 % para 10,8 % (WANG *et al.*, 2014). Comparando com cepas menos halotolerantes, o genoma da cepa SENEW3 tolerante ao sal, revelou conter um conjunto de funções adicionais, sendo que 24 genes dos quais foram derivados de fontes bacteriana, funcionavam em resposta ao estresse salino (FOFLONKER *et al.*, 2015). Segundo DITTAMI *et al.*, (2016), culturas privadas de bactérias associadas (culturas axênicas) dificilmente são capazes de sobreviver a um estresse causado por mudança intensa de salinidade, enquanto que essa capacidade pode ser restaurada pela recomposição da microbiota bacteriana.

O fator da temperatura é relevante com cepas de algas cultivadas industrialmente em sistemas de produção superintensivo tipo raceway, sistema de fluxo laminar ou biorreatores de tela plana, que normalmente são expostos a consideráveis flutuações de temperatura. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cresce melhor em uma temperatura entre 20 e 32 °C

(SCHRODA, 2004), por exemplo. A transferência direta de *C. reinhardtii* de uma temperatura ótima (25 °C) a uma temperatura alta (45 °C) resulta em clorose e morte celular, causadas pela repressão da enzima metionina sintase, dependente de cobalamina, durante o estresse por calor. Através da adição de cobalamina exógena ou coculturas de alga com uma bactéria produtora de cobalamina como é *Sinorhizobium meliloti*, a enzima metionina sintase dependente de cobalamina, pode ser reativada mediante a biossíntese de metionina, impedindo assim a morte das células algais (XIE *et al.*, 2013).

1.3.3 Fornecimento de nutrientes

Certamente, as microalgas precisam principalmente de CO₂, fontes inorgânicas de nitrogênio e fosfato para crescimento, junto com alguns micronutrientes e cofatores (SINGH; DAS, 2014). Nos cultivos de microalgas, o custo com os nutrientes é responsável por uma grande parte dos custos de produção, assim, a reciclagem ou o fornecimento desses nutrientes via bacteriana pode, eventualmente, permitir que a produção de biomassa de microalgas em larga escala seja mais economicamente viável (CLARENS *et al.*, 2010).

1.3.4 Macronutrientes

Frequentemente o CO₂ é o substrato limitante em cultivos intensivos de microalgas, constitui ao redor de 50% da biomassa (CHISTI, 2007; PUTT *et al.*, 2011). Uma estratégia para aumentar as baixas concentrações de CO₂ em culturas de algas é aumentar a pressão do CO₂ no sistema de cultivo através da injeção de ar atmosférico enriquecido com CO₂, embora o fornecimento adicional do CO₂ tem um custo significativo (CLARENS *et al.*, 2010).

Como alternativa e como fonte adicional de CO₂ é possível o eventual aproveitamento do CO₂ resultante da ação bacteriana na degradação de compostos orgânicos liberados pelas microalgas contribui com uma fonte adicional de CO₂ para seu crescimento, pois esse Carbono pode ser fixado novamente, por parte das microalgas (SUBASHCHANDRABOSE *et al.*, 2011).

Assim como há bactérias relacionadas ao ciclo do carbono, também existem bactérias fixadoras de nitrogênio que reduzem o dinitrogênio (N₂) atmosférico a amônia que é uma fonte de nitrogênio a qual algumas microalgas tem preferência para ser assimilado no interior da célula (SINGH; DAS, 2014). Por exemplo, *Bacillus pumilus* ES4 é um bacilo promotor de crescimento que fixa nitrogênio para aumentar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* (HERNANDEZ *et al.*, 2009).

Essa fixação simbiótica do nitrogênio também está presente nos holobiontes de corais, onde ocorre com o *Symbiodinium*, que é o gênero de dinoflagelado mais comumente associado aos corais (SILVERSTEIN; CORREA; BAKER, 2012). Estudos revelaram uma correlação positiva entre a densidade celular de *Symbiodinium* e o número de cópias de genes de fixação de nitrogênio de bactérias fixadoras, que demonstram parcialmente como os corais e seus simbiontes dinoflagelados poderiam sobreviver com condições de baixo teor de nutrientes (RESHEF *et al.*, 2006).

Outro nutriente essencial para o crescimento das microalgas é o fósforo. Na maioria dos casos, as algas só podem assimilar fosforo inorgânico (Pi) derivado da hidrólise do fósforo orgânico (Po) (ZHU *et al.*, 2013). Sendo que, as bactérias são os principais agentes envolvidos na decomposição e mineralização do Pi através da secreção de enzimas fosfatases (KONONOVA; NESMEYANOVA, 2002). O Po oriundo da decomposição das células algais mortas pode então ser reciclado otimizando o rendimento. ZHAO *et al.*, (2012) demonstraram a ocorrência desse processo em lagos eutróficos com abundante Po mais limitado Pi onde *Gordonia* sp. txj1302RI e *Burkholderia* sp. txj1302Y4, degradaram o Po fornecendo o Pi necessário para o crescimento de *Microcystis aeruginosa*.

Assim, ao considerar as relações complexas e incalculáveis que microalgas e as bactérias possam ter, há uma necessidade importante de se estudar essas associações e suas inter-relações. Além disso, a maioria das questões relacionadas à comunicação entre microalgas e bactérias de modo recente podem ser abordada usando ferramentas ômicas. (AMIN *et al.*, 2015; RAMANAN *et al.*, 2016; RAYMOND, 2014; SCHÖNKNECHT *et al.*, 2013).

1.4 IMPORTÂNCIA DO 16S RNAr NAS CARACTERIZAÇÕES BACTERIANAS

Dentre as múltiplas formas de caracterização de micro-organismos, o gene 16S RNAr é comumente utilizado para realizar estudos filogenéticos em Bactérias e Archeas. Este gene contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9) que podem ser utilizadas para estudos de taxonomia (YANG; WANG; QIAN, 2016). Recentemente, a análise do gene 16S RNAr nas comunidades bacterianas foi investigado em fragmentos de gelo, sangue, solo, amostras da água e intestino de animais, se mostrando como uma alternativa que viabiliza estudos da microbiota bacteriana em diferentes ecossistemas, ambientes e organismos (KERKHOF *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2016).

Eventualmente, a precisão nas análises do gene 16S RNAr na identificação de bactérias depende diretamente de vários fatores relacionados à preparação da biblioteca, sequenciamento

de DNA e análise de dados (GOHL *et al.*, 2016). Os métodos atualmente disponíveis para determinar a diversidade bacteriana, dependem maiormente do sequenciamento “Illumina” ou também chamado de sequenciamento por sínteses, baseado em de regiões curtas e hipervariáveis no 16S RNAr (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007).

Com finalidade de procurar algumas alternativas aos métodos tradicionais para estudar as interações das associações bacterianas em várias aplicações biotecnológicas, onde se incluem a microscopia, classificação de células, espectrometria de massa e engenharia genética, inegavelmente o aparecimento das ferramentas ômicas atualmente fornecem uma compreensão melhor e clara das relações entre microalga-bactéria (DE ROY *et al.*, 2014).

1.5 SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO

O aparecimento da metagenômica e de outras metodologias ômicas (como metabolômica, transcriptômica, lipidômica e proteômica) está permitindo que sejam esclarecidos os mecanismos de interação entre microalgas e bactérias. Por exemplo, a tecnologia de Sequenciamento De Alto Rendimento do inglês *High Throughput Sequencing (HTS)* é uma abordagem de clonagem imparcial que ajuda na identificação da diversidade bacteriana da ficosfera e os aspectos funcionais das comunidades bacterianas (COOPER; SMITH, 2015). Além do sequenciamento do DNA, a tecnologia do *HTS* também pode ser utilizada para sequenciar o RNA ambiental, independentemente da riqueza e abundância relativa das comunidades presentes em determinadas associações (COOPER; SMITH, 2015).

Em geral, para ser considerado um marcador molecular para estudos de índices de diversidade ou em qualquer estudo taxonômico ou evolutivo, uma região do DNA deve atender às seguintes características: conter variabilidade e divergência genética significativas ao nível da espécie; apresentar locais conservados adjacentes, que permitem o projeto de iniciadores universais para sua amplificação por PCR; ter um comprimento adequado que permita a extração e o sequenciamento de maneira fácil, reproduzível e precisa (KRESS; ERICKSON, 2012).

Claramente os índices de diversidade são uma maneira de avaliar ou caracterizar às comunidades bacterianas de um ecossistema, de modo que a capacidade do par de iniciadores (*primers*) a região do gene 16S RNAr que são amplificados, tenham um efeito determinante na descrição da diversidade bacteriana. Por exemplo, em uma análise de populações de sedimentos microbianos, Miller *et al.* (2013) utilizaram a região V3 e V4 do gene 16S RNAr como uma ferramenta taxonômica, em vez da sequência completa e observaram que, a diversidade

estimada era maior e o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) que não podiam ser classificadas, mesmo no nível mais avançado, aumentou de 8,6% para 34,6%. Na caracterização de comunidades de águas residuais microbianas, as informações obtidas com um fragmento contendo as regiões V1 e V2 não foram suficientes para detectar organismos dos Filos de Verrucomicrobia, Planctomycetes e Chlamydiae (CAI *et al.*, 2013).

Embora, o *HTS* tenha levado a uma explosão de estudos de diversidade bacteriana em pesquisa ecológica, há um número limitado de estudos publicados na análise da microbiota no contexto dos sistemas de produção de microalgas baseada nessa técnica. De fato, a maioria do conhecimento das comunidades de bactérias e algas em cenários aplicados às análises provêm de estudos de tratamento de águas residuais (GARCÍA *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018).

Ultimamente o sequenciamento de alto rendimento, está permitindo a obtenção de resultados rápidos e de alta resolução, revolucionando o campo da microbiologia. Inúmeros micro-organismos que não poderiam ser cultivados, agora podem ser caracterizados usando técnicas moleculares baseadas em sequências de DNA. O gene 16S RNAr é realmente um marcador versátil e disponível, uma vez que possui resolução filogenética entre bactérias e um dos maiores bancos de dados de sequência do DNA (HUGENHOLTZ; SKARSHEWSKI; PARKS, 2016; YANG; WANG; QIAN, 2016).

1.6 OBJETIVO GERAL

A caracterização das comunidades bacterianas associadas às culturas da microalga *Scenedesmus obliquus* em três sistemas de cultivo: Sistemas de Cultivo de Bancada, Fotobiorreator tipo *flat-panel* e no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas. Mediante uma abordagem da metagenômica.

1.6.1 Objetivos Específicos

Identificar as bactérias associadas às culturas da microalga *S. obliquus* em relação aos diferentes sistemas de cultivo (Sistema de Cultivo de Bancada, Fotobiorreator Tipo *Flat-Panel* e no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas), usando sequenciamento de alto rendimento, com o gene RNAr 16S.

Determinar a Diversidade, a Dominância, a Riqueza dos organismos que constituem as comunidades bacterianas nos sistemas de cultivo.

2 ARTIGO CIENTIFICO

Artigo a ser submetido à revista Algal Research (ISSN: 2211-9264, IF: 3,994, Qualis A1, Área Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

Caracterização das comunidades bacterianas presentes em diferentes sistemas de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* usando sequenciamento de próxima geração (HTS)

Jaimet Bucheli*, Herculano Cella, Camila Nader, Rafael Garcia Lopes & Roberto Bianchini
Derner

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Cultivo de Algas, Florianópolis, Brasil

*Autor correspondente: fer-1110@hotmail.com

2.1 INTRODUÇÃO

As aplicações biotecnológicas das microalgas, para a produção de biomassa e para a obtenção de biocompostos, têm abordado o estudo de diferentes gêneros de microalgas tanto marinhas quanto dulcícolas. Dentre diversos gêneros, *Scenedesmus* apresenta algumas características de interesse biotecnológico e de cultivo, como: alto rendimento em biomassa e alta produtividade lipídica, sendo que, a biomassa de espécies desse gênero também contém elevada concentração de aminoácidos essenciais e relevante conteúdo proteico e mineral, podendo ser empregada como complemento nutricional de organismos usados como alimento vivo (rotíferos, copépodes, artêmia etc.) empregados na aquicultura [1].

Ainda das possíveis aplicações de representantes desse gênero, Mandal e Mallick [2] e Álvarez-Díaz *et al.* [3] reportam que, a espécie *S. obliquus* têm potencial para a produção de biocombustíveis, para a biofixação de CO₂ e para a biorremediação. Em virtude dessas características, a microalga *S. obliquus* tem despertado interesse em desenvolver trabalhos relacionados à produção em diferentes escalas, tanto para aquicultura quanto para aplicações biotecnológicas, comprovando que esta espécie alcança elevada biomassa em sistema de cultivo superintensivo [4]. Também alcança adequados teores de ácidos graxos poli-insaturados para uso industrial [5] e apresenta uma rápida adaptação a diferentes concentrações de meios de cultura sem afetar o crescimento e a composição bioquímica [6]

Desde sua origem, a maioria das microalgas tem habitado em simbiose com múltiplos micro-organismos associados [7]. Em geral, nas culturas de microalgas, busca-se evitar a contaminação com bactérias, entretanto, quando em condições axênicas, ditas culturas frequentemente exibem crescimento menor ou apresentam anomalias fenotípicas. Isso indica que a associação entre microalgas e outros micro-organismos é importante para o desenvolvimento das culturas [8].

Como aspectos positivos para as microalgas, considera-se que as bactérias sintetizam compostos importantes para estimulação do crescimento microalgal, para a germinação de esporos, para a morfogênese e para a resistência a patógenos [9,10]. Esses compostos incluem micronutrientes, sideróforos, estimulantes de crescimento e antibióticos [11–14]. Do mesmo modo, determinados micro-organismos simbióticos ajudam as microalgas que os hospedam a lidar com mudanças nas condições ambientais [15,16]. Em contrapartida, as microalgas liberam na água matéria orgânica dissolvida e moléculas sinalizadoras para a nutrição de comunidades bacterianas específicas [10].

Assim, ao se considerar o número de espécies de microalgas e de bactérias e suas relações complexas, há uma necessidade importante de se estudar essas uniões e suas inter-relações separadamente. Além disso, a maioria das questões relacionadas à comunicação entre microalgas e bactérias pode ser abordada usando ferramentas moleculares [9,17–19].

Atualmente, as ferramentas ômicas estão fornecendo resultados rápidos e de alta resolução, revolucionando o campo da microbiologia. Assim, muitos micro-organismos que não puderam ser cultivados, podem agora ser caracterizados utilizando técnicas moleculares baseadas em sequências de DNA ou RNA. Para tanto, tem sido empregado o 16S RNAr, que é um gene marcador mais versátil e disponível, uma vez que possui boa resolução filogenética entre bactérias e um dos maiores bancos de dados de sequência do DNA [20,21].

Similarmente, são caracterizadas algumas comunidades bacterianas em diferentes espécies de microalgas, tanto marinhas quanto de água doce, [22–24]. Pontualmente, no gênero *Scenedesmus*, Krohn-Molt *et al* [25] caracterizaram a microbiota bacteriana sequenciando o RNAr da microalga *S. quadriculata* além de descrever o metatranscriptoma, em um sistema de fotobiorreator.

Nesse trabalho se propõe a caracterização das comunidades bacterianas associadas aos diferentes sistemas de cultivo da microalga *S. obliquus*, buscando futuramente um melhor entendimento das interações benéficas entre as bactérias e as microalgas. Desse modo, este trabalho teve como objetivos identificar bactérias associadas à microalga *S. obliquus* encontradas na fase de crescimento exponencial em relação aos diferentes sistemas de cultivo




Sistema de Cultivo de Bancada, Sistema Fotobiorreator tipo *Flat Panel* e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material biológico e condições experimentais

Nas culturas experimentais foi utilizada uma cepa *Scenedesmus obliquus*, isolada há mais de 10 anos e mantida no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade de Federal de Santa Catarina. Os cultivos experimentais foram desenvolvidos sequencialmente a partir de um único inoculo em três diferentes sistemas de cultivo: Sistema de Bancada (SCB), constituído por frascos de 2 L; Sistema Fotobiorreator tipo *flat-panel* (SFFP), com 100 L; considerados sistemas intensivos e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA), com 180 L, considerado como sistema superintensivo. As características e condições ambientais das culturas experimentais estão apresentadas na Tabela 2.

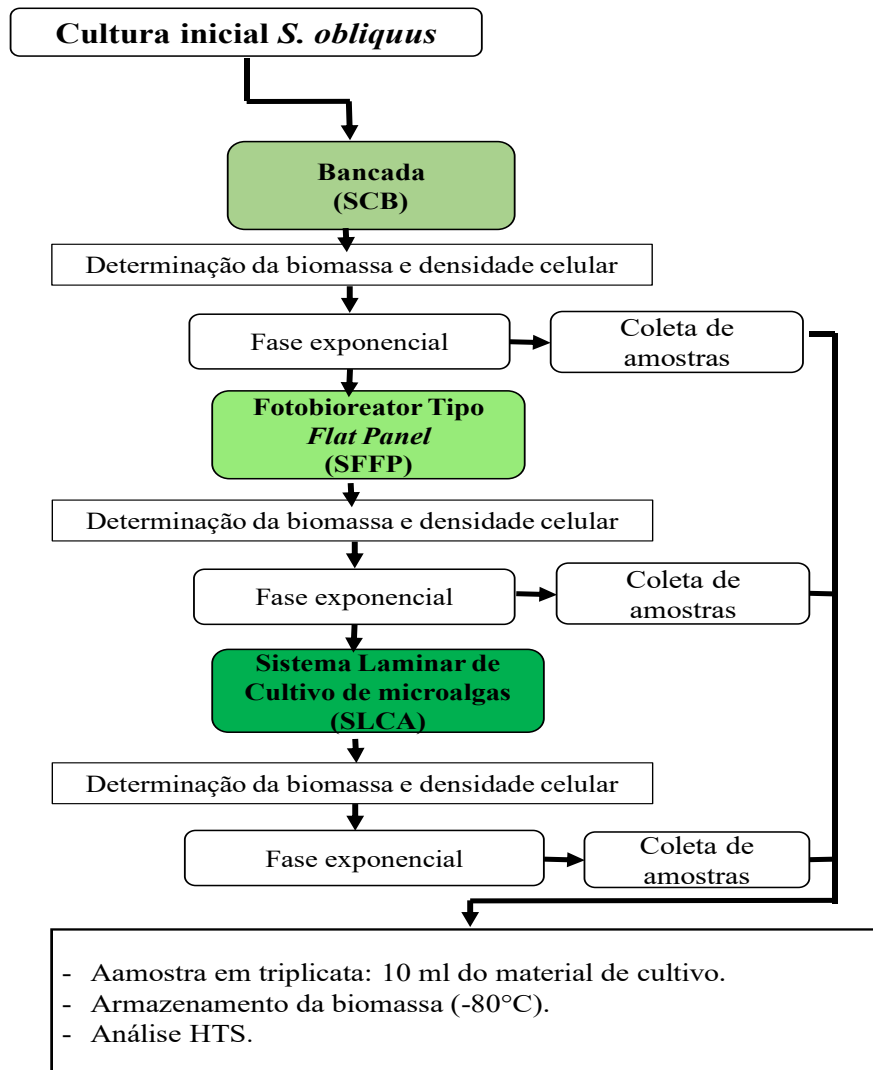
Tabela 2 - Características e condições ambientais em cada sistema de cultivo experimental de *S. obliquus*.

| Sistemas de cultivo | Culturas | Características físico-técnicas | Temperatura | Identificação | Iluminação |
|---------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---------------|---|
| Bancada |  | Frascos de borossilicato, 2 L com aeração | $24 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ | SCB | Artificial de $400 \text{ } \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em fotoper\u00edodo 24:0 |
| Fotobiorreator tipo <i>flat panel</i> |  | Polietileno, 100 L, com aeração | $24 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ | SFFP | Artificial de $400 \text{ } \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em fotoper\u00edodo 24:0 |
| Laminar de Microalgas |  | Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas, 200 L, com aeração | Ambiente | SLCA | Natural em fotoper\u00edodo 12:12 |

Fonte: Elaborada pelo autor, Fotografias Laboratório de Cultivo de Algas (2020).

Nas culturas experimentais foi empregado o Meio de cultura LCA-AD contendo: 1,0 g L⁻¹ NaNO₃; 0,75 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 0,6 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,05 g L⁻¹ EDTA-Na₂; 0,03 g L⁻¹ KOH; 0,25 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,25 g L⁻¹ NaCl; 0,25 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O; 0,11 g L⁻¹ H₃BO₃; 0,05 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O; 0,014 g L⁻¹ MnCl 4H₂O; 0,016 g L⁻¹ CuSO₄ 5H₂O; 0,00071 g L⁻¹ MoO₃; 0,0004 g L⁻¹ Co (NO₃) 6H₂O [5]. Os cultivos experimentais foram desenvolvidos a partir de uma mesma cultura inicial (inóculo) de forma sequencial na seguinte ordem SCB, SFFP e SLCA (Fig. 3).

Figura 3 - Fluxo de cultivo da microalga *S. obliquus* com relação à metodologia proposta para a realização do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As culturas de SCB e SFFP foram mantidas com agitação constante através do borbulhamento com ar atmosférico com adição de 0,5% de CO₂ (v/v). As culturas no SLCA foram mantidas em circulação constante com auxílio de duas bombas hidráulicas para o

aumento da oferta de carbono, foi injetado empregando CO₂ (100%, v/v) através de borbulhamento. Foram coletadas amostras diariamente para a determinação dos parâmetros de cultivo relacionados ao crescimento das culturas (densidade celular e biomassa). A densidade celular foi determinada pela contagem diária de células empregando a Câmara de Neubauer e microscópio óptico e a biomassa foi determinada através do método gravimétrico[26].

2.2.2 Sequenciamento de alto rendimento

As análises das comunidades bacterianas presentes nas culturas foram desenvolvidas através da técnica de sequenciamento de alto rendimento (*HTS*), procedimento que foi feito pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil). Nos três sistemas de cultivo, foi realizada uma coleta por sistema de cultivo em três réplicas, no momento em que as culturas se encontravam na fase de crescimento exponencial, perfazendo um total de nove amostras. Os procedimentos de coleta, preparação e armazenamento das amostras foram realizados conforme o protocolo descrito por Christoff *et al.* [27], (Figura 3). Esta abordagem consta fundamentalmente dos seguintes passos: (1) Extração de DNA de um conjunto de amostras; (2) Amplificação da região alvo de aproximadamente 400 pares de bases (pb) usando a PCR, com um par de iniciadores que tem como objetivo a informação das regiões conservadas em ambos os lados amplificados; (3) Codificação dos *amplicons* iniciais em sequências curtas; (4) Combinação dos *amplicons* iniciais em uma única execução de sequenciamento criando milhares de cópias daqueles fragmentos. Após esses processos, o processamento de dados resulta em uma lista de abundâncias de táxons compostas individualmente pelas unidades taxonômicas operacionais (UTOs) presentes em cada amostra [28].

2.2.2.1 Extração e amplificação do DNA Bacteriano

O DNA bacteriano correspondente às amostras das culturas de *S. obliquus* foi extraído utilizando o kit de purificação *DNA Genomic Wizard* (Promega Corp., Madison, WI, EUA) e foi armazenado a -20 °C. O DNA genômico total das amostras, foi usado como modelo para o sequenciamento de alto rendimento utilizando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). A preparação da biblioteca foi realizada utilizando o protocolo descrito por Christoff *et al.* [27]. Resumidamente, a região hiper variável V3-V4 do gene 16S RNAr foi

amplificada com os iniciadores encontrados nas regiões conservadas e hiper variáveis descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequência de iniciadores usados para o sequenciamento.

| Primer | Sequência | Referência |
|--------|----------------------|------------|
| 341F | CCTACGGGRSGCAGCAG | [29] |
| 806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT | [30] |

2.2.2.2 Amplificação por PCR

A reação de PCR foi realizada em triplicata utilizando o reagente *Platinum Taq Polymerase* (Invitrogen, EUA) com as seguintes condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 45 s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. A preparação da biblioteca (anexo de adaptadores *TruSeq*, purificação com esferas AMPureXP e quantificação qPCR) foi realizada usando o protocolo de preparação da biblioteca Illumina 16S (nota técnica Illumina 15044223 Rev. B)[31]. O sequenciamento foi realizado usando o Kit *MiSeq Reagent V3* com reações emparelhadas de 2 × 300 bp.com uma abrangência de 50.000 leituras por amostra [27]

2.2.2.3 Identificação do DNA bacteriano

Os dados de sequenciamento para cada amostra foram processados no software Quantitative Insights on Microbial Ecology (QIIME) [30]. Inicialmente, a saída do sequenciamento foi analisada por um filtro de qualidade de leitura, para a remoção de leituras com uma pontuação média de Phred <20 seguida por um agrupamento de leituras 100% idênticas. Para a remoção de sequências quiméricas putativas, foram excluídos de análises posteriores os grupos com menos de 30 leituras. As demais sequências de boa qualidade foram agrupadas em 97% de semelhança para definir UTOs. A classificação das UTOs foi realizada comparando-as com um banco de dados 16S RNAr personalizado (NEORefDB, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). As sequências foram atribuídas taxonomicamente com pelo menos 99% de identidade no banco de dados de referência [30].

2.2.3 Determinação da Riqueza, Diversidade e Dominância

As sequências foram atribuídas taxonomicamente no banco de dados de referência utilizados pela empresa NEOPROSPECTA [27]. Para avaliar as mudanças da comunidade bacteriana entre as amostras, foi empregado o visualizador Krona para os níveis Filo e Classe. Para o nível taxonômico Família foi elaborado um gráfico de abundância relativa, enquanto que para o nível de espécie as UTOs foram normalizadas com o valor de raiz quadrada, foram usados os índices de α -diversidade. Onde, foi calculado o índice diversidade de Shannon-Weiner (KREBS, 1998), índice de dominância (SIMPSON, 1949) e o índice de Riqueza realizadas no Software Past. Posteriormente foram testadas a normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) empregando o software Past. Foi aplicado o teste paramétrico de ANOVA e Tukey com o mesmo software e as diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. Para os parâmetros número de leituras, diversidade de Shannon e dominância de Simpson, os dados estão apresentados como as médias das réplicas técnicas ($n=3$) \pm desvio-padrão. A análise do possível core bacteriano foi realizada através da elaboração de um Diagrama de Venn, mediante a utilização da ferramenta disponível no site <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, do grupo *Bioinformatics and Evolutionary Genomics*, Universidade de Ghent, Alemanha. As abundâncias relativas foram comparadas através de um *heatmap*, utilizando o índice de correlação de Spearman, empregando a ferramenta *Heatmapper* [32] disponível no endereço, <http://www.heatmapper.ca/expression/>. A análise de agrupamento hierárquico (coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) foi realizada com base nas abundâncias relativas das UTOs das espécies entre os diferentes sistemas de cultivo com emprego do software Primer 6.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Biomassa

O crescimento em Biomassa das culturas sequenciais da microalga *S. obliquus* desenvolvidas nos três sistemas de cultivo: Bancada (SCB); Fotobiorreator tipo *flat-panel* (SFFP); e Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA). No SCB a cultura foi iniciada com uma biomassa (peso seco) de $0,26 \text{ g L}^{-1}$ e, após 6 dias alcançou a fase exponencial, com uma biomassa de $1,37 \text{ g L}^{-1}$. Nesse momento a cultura foi integralmente transferida para o SFFP, resultando em uma biomassa inicial de $0,30 \text{ g L}^{-1}$ e, quando alcançou a fase exponencial em 5

dias, com biomassa de $1,12 \text{ L}^{-1}$, foi transferida integralmente para o SLCA, resultando em uma biomassa inicial de $0,52 \text{ g L}^{-1}$, chegando ao final da fase exponencial após 15 dias e alcançando biomassa de $9,03 \text{ g L}^{-1}$.

De acordo com OLIVEIRA *et al.* [5,6] e VENANCIO *et al.* [4] os valores de biomassa foram semelhantes aos valores obtidos no presente trabalho, sendo de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ no quinto dia de cultivo e 12 g L^{-1} no quinquagésimo dia de cultivo.

2.3.2 Descrição da riqueza, diversidade e dominância das comunidades bacterianas presentes nos sistemas de cultivo da microalga *S. obliquus*

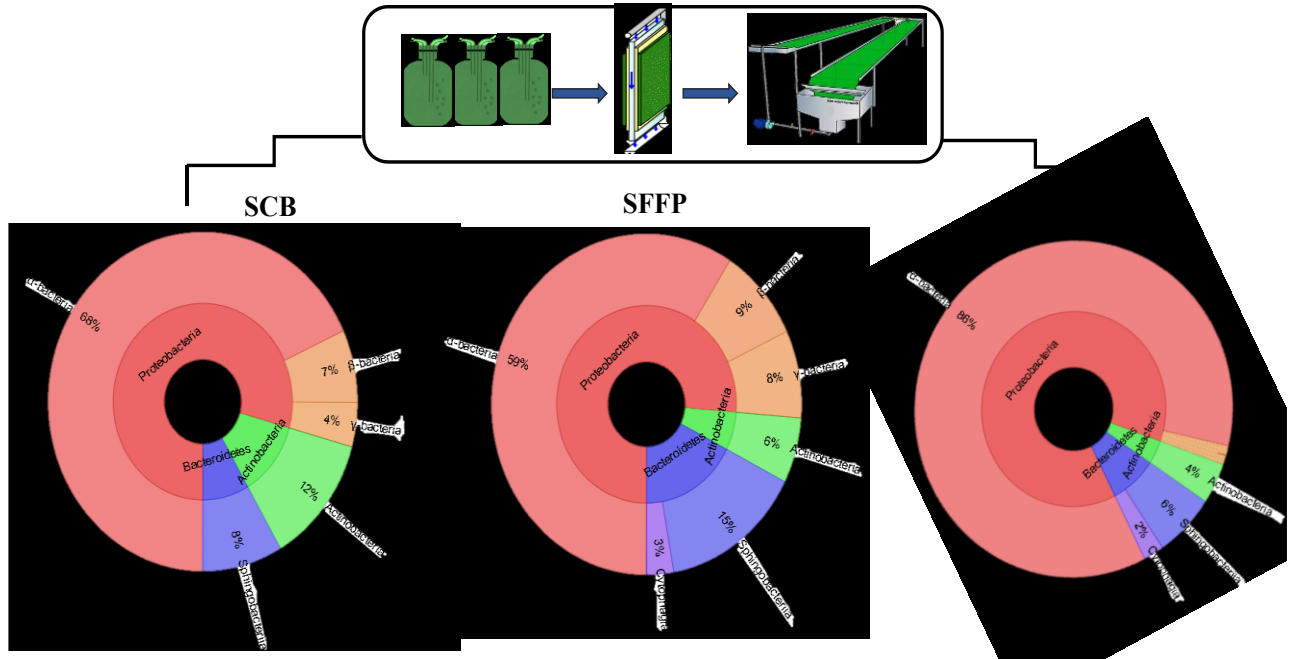
A composição das comunidades bacterianas associadas aos sistemas de cultivo de *S. obliquus*, foi analisada em diferentes níveis taxonômicos mediante o sequenciamento Illumina MiSeq, foram produzidas 195.177 leituras, permitindo a identificação de 85 UTOs com uma faixa de 25.000 a 30.000 leituras por replica técnica nos três sistemas de cultivo. No agrupamento das comunidades bacterianas foram encontrados três Filos (Figura 4), seis Classes (Figura 4), vinte nove famílias (Figura 5) e trinta e cinco espécies (Figura 7).

A figura 5 apresenta a classificação taxonômica das comunidades bacterianas em termos de abundâncias relativas para os níveis de Filo, Classe e Ordem identificados nas culturas experimentais.

Sendo que os Filos apresentaram uma abundância relativa de 71% a 90% no Proteobactéria, 6% a 16% no Bacteriodetes e de 3% a 15% no Actinobacteria, estando presentes nos três sistemas de cultivo na fase de crescimento exponencial.

Em relação a Classe, as abundâncias relativas maiores foram: com 60% a 89% Alphaproteobactéria, sendo o SLCA o sistema com maior dominância dessa Classe bacteriana com uma abundância relativa aproximada ao 80%, a abundancia relativa na Classe Actinobacteria foi de 5% a 15% na fase de SCB e SFFP e de 6% a 17% na Classe Sphingobacteriia sendo dominante no SFFP de 12% a 17%.

Figura 4 - Composição taxonômica (Filo e Classe) das comunidades bacterianas presentes nas culturas de *S. obliquus* no Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), no Sistema Fotobiorreator tipo *flat panel* (SFFP) e no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA).



As Classes pertencentes ao Filo Proteobactérias foram abreviadas: α -bactéria: Alphaproteobactéria, β -bactéria: Betaproteobactéria, γ -bactéria: Gammaproteobactéria.

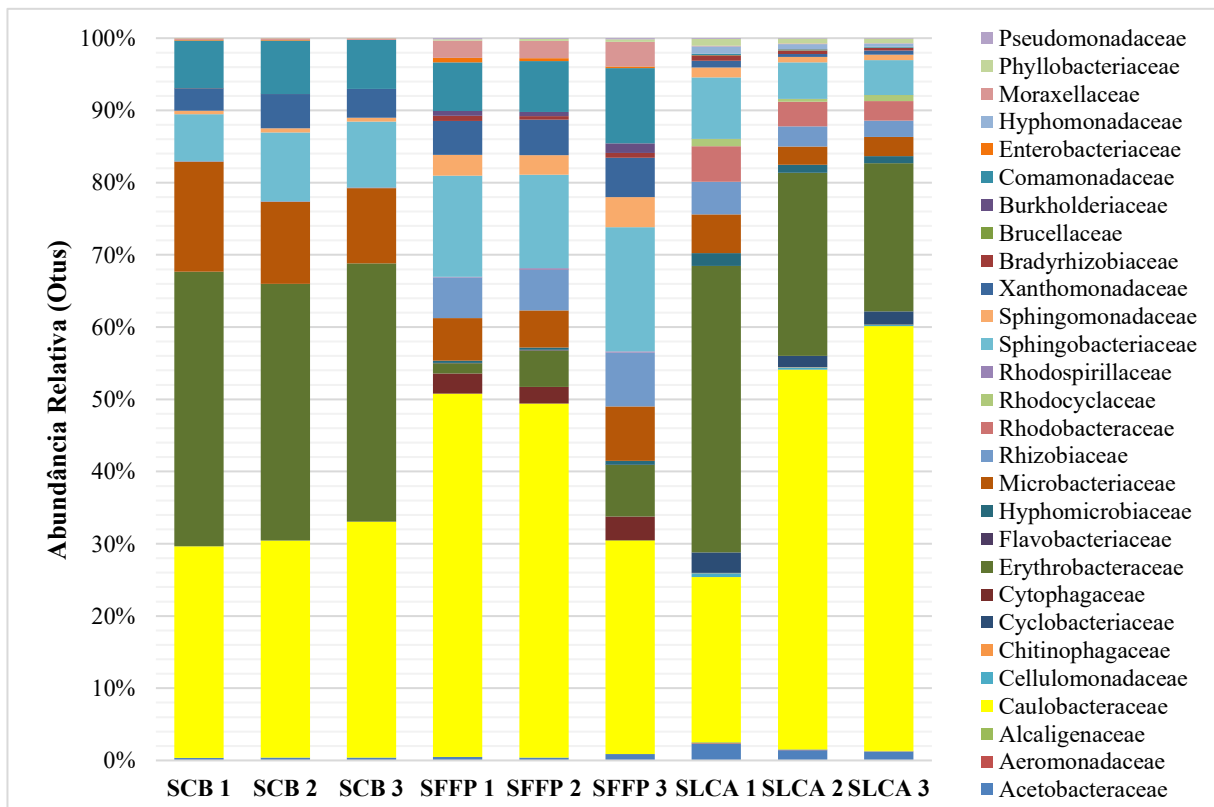
De acordo com Ramanan *et al.* [9], nos ensaios filogenéticos demonstram que as bactérias pertencentes aos Filos Proteobactéria e Bacteroidetes são mais propensas a estabelecer interações com microalgas Clorofíceas. Coincidindo com a classificação filogenética a nível de Filo descrita por Sánchez-Zurano *et al.* [23] num Sistema de Fluxo Laminar, que o Filo Proteobactérias foi comumente registrado, variando entre 55% e 70% ao longo dos meses do teste, enquanto o Filo Bacteroidetes foi o segundo mais abundante nas amostras, com registro entre 8% e 20% nas culturas da microalga *S. obliquus* quando foi cultivada utilizando águas residuais como única fonte de nutrientes. Conforme Abell e Bowman [33], a maioria de bactérias pertencentes a esses Filos compartilha a capacidade de degradar rapidamente a matéria orgânica sustentando uma potencial transferência direta de carbono orgânico das microalgas para as bactérias.

Krohn-Molt *et al.* [34] também relatam a dominância da Classe Alphaproteobactéria estando presente em quase 75% da comunidade bacteriana, junto com Bacteroidetes, Betaproteobactéria no biofilme de cultura de *C. vulgaris* e de *S. obliquus* cultivadas de forma conjunta num sistema de fotobiorreator. As classes Sphingobactéria e Actinobactéria também foram encontrada em baixas proporções em cultivo de *S. obliquus*. Num sistema de fluxo

laminar, Sánchez-Zurano *et al.* [23] sendo que resultados similares foram encontrados no presente trabalho, onde a Classe de Alphaproteobactéria foi altamente dominante no SLCA e as classes Actinobacteria e Sphingobacteriia estiveram presentes em todos os sistemas de cultivo.

Na Figura 5 são apresentadas as comunidades bacterianas ao nível de Família. A Família com maior abundância relativa foi Caulobacteraceae no SFFP e SLCA. No SCB a abundância de Caulobacteraceae apresentou variação entre 29% e 32%, no sistema SFFP foi de 29 a 50%, e um aumento no SLCA com valores entre 22% e 58%. A Família Erythrobacteraceae foi a segunda mais representativa com abundância relativa no SCB variando de 35% a 38%, tendo uma drástica redução no SFFP, com abundância de 1% a 7% e aumentando no SLCA com valores entre 20% e 39%. A família Sphingobacteriaceae teve abundância relativa nos SCB e SLCA de 4% e 9%, enquanto no SFFP de 12% a 17%. Microbacteriaceae apresentou abundância relativa de SFFP e SLCA de 2% a 7%, enquanto no SCB foi de 10% a 15%. Essas quatro famílias totalizaram de 70% a 87% das comunidades bacterianas registrada nos sistemas de cultivo desse estudo.

Figura 5 - Abundância relativa ao nível de Família das comunidades bacterianas registradas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo *flat panel* (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA).



De acordo com Krohn-Molt *et al.* [34] em estudo realizado com biofilme presente em um fotobiorreator onde foram cultivadas em conjunto as microalga *C. vulgaris* e *S. obliquus*, foi observada maior abundância relativa de bactérias das famílias Sphingomonadaceae, Caulobacteraceae, Rhizobiaceae, Xanthomonadaceae. Vale ressaltar que no trabalho de Krohn-Molt *et al.* [25], as principais famílias bacterianas observadas pertencem às Comamonadaceae, Caulobacteraceae, Chitinophagaceae, Flexibacteraceae, e Sphingomonadaceae, e, o autor corrobora que as comunidades bacterianas associadas à Classe Cloroficea parecem se amoldar aos diferentes fatores bióticos e abióticos, onde provavelmente compartilham em sua estrutura filogenética conteúdo de informação genômica que permita ter algumas comunidades que permanecem independentemente dos fatores bióticos e abióticos [34]. Os resultados de Krohn-Molt *et al.* [34] em relação às famílias são semelhantes àqueles obtidos no presente trabalho, sendo as famílias Caulobacteraceae e Erythrobacteraceae as mais abundantes.

Nas culturas desenvolvidas sequencialmente nos três sistemas de cultivo, o número observado de espécies variou entre treze e vinte e quatro (Tabela 4), A maior diversidade foi observada no SFFP (24 espécies), seguido pelo SLCA (19 espécies). Para entender a estrutura bacteriana das amostras, tanto a diversidade quanto a dominância foram medidas pelos índices de Shannon e Simpson respectivamente. Onde, se apresenta uma diversidade e riqueza baixa no SCB em contraste com SFFP e SLCA onde apresenta uma diversidade e riqueza maior. A Dominância é alta em todos os níveis de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4 - Métricas de Diversidade Alfa das comunidades bacterianas das culturas de *S. obliquus* desenvolvidas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo *flat panel* (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA).

| Sistema de Cultivo | Riqueza (n° espécies) | Número de Leituras | Diversidade (Índ. de Shannon-Weaver) | Dominância (Índ. de Simpson) |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|
| SCB | 13 | 24.039,3 ±10.900 ^b | 1,75 ±0,04 ^b | 0,78 ±0,01 ^b |
| SFFP | 24 | 33.156 ±40.985 ^a | 2,53 ±0,10 ^a | 0,89 ±0,02 ^a |
| SLCA | 19 | 24.522,3 ±14.409 ^b | 2,31 ±0,21 ^a | 0,82 ±0,06 ^{ab} |

Dados médios ±desvio padrão, n = 3. ANOVA simples. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey, p<0,05).

Krohn-Molt *et al.* [34] encontraram 28 UTOs no biofilme aderido às paredes de um fotobiorreator onde foram cultivadas as microalgas *S. obliquus* e *C. vulgaris*. As análises moleculares indicaram que a comunidade microbiana foi bastante estável ao longo do tempo de cultivo. Diferentemente, onde foram empregados três diferentes sistemas de cultivo. Nesse trabalho onde foram empregados três diferentes sistemas de cultivo de *S. obliquus* e o número

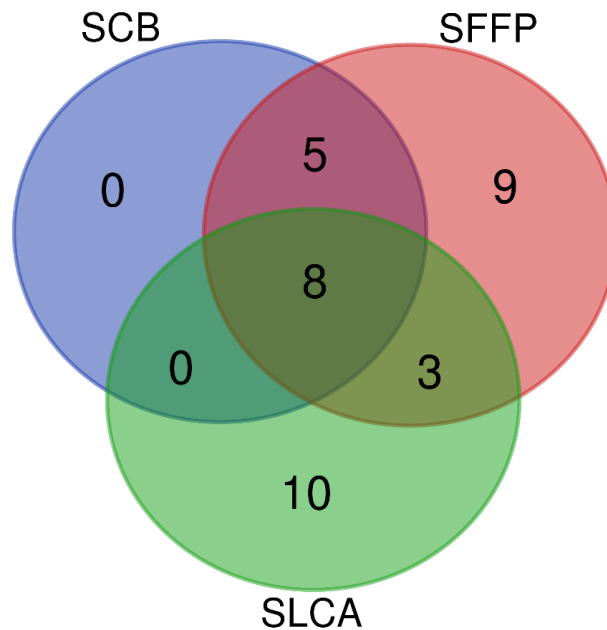
de UTOs foi de 35 nas espécies sendo superior aos resultados obtidos por Krohn-Molt *et al.* [34].

De acordo com Kublanovskaya *et al.* [24], a diversidade bacteriana das culturas de laboratório, desenvolvidas em ambientes fechados, é muito menor de que a diversidade encontrada em amostras de cultivo em ambientes abertos ou nos ambientes naturais. Esse fato foi corroborado no presente estudo, uma vez que, o SCB, sistema fechado e em escala de laboratório (2,0 L), foi o sistema com menor diversidade, enquanto que a diversidade bacteriana aumentou sensivelmente no SFFP, que ainda mantinha condições laboratoriais porém tinha maior volume (100 L). Já no sistema SLCA, um sistema superintensivo de cultivo e sob condições ambientais naturais (*outdoor*), houve uma redução na diversidade possivelmente o ambiente externo tenha influenciando o aparecimento e a supressão de algumas espécies, formando novas comunidades. Vale ressaltar a ocorrência e a dominância de algumas espécies em todos os três sistemas de cultivo estudados.

Na figura 6 é apresentado o Diagrama de Venn, considerando as comunidades bacterianas comuns e específicas identificadas em cada um dos três sistemas de cultivo. As espécies descritas foram 9 espécies para o SFFP e 10 espécies únicas para o SLCA, enquanto no SCB não se obteve dados sobre espécies únicas. A possível comunidade bacteriana presente em todas as amostras (comunidade core) está composta pelas seguintes espécies de bactérias: *Aquimonas voraii*, *Hydrogenophaga intermedia*, *Phenylobacterium falsum*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseoglobus frigidaquae*, *Rhizobium rosettiforman*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Porphyrobacter neustonensis*, as quais foram registradas no três sistemas de cultivo, tendo somente ocorrido variações na quantidade de UTOs entre cada sistema.

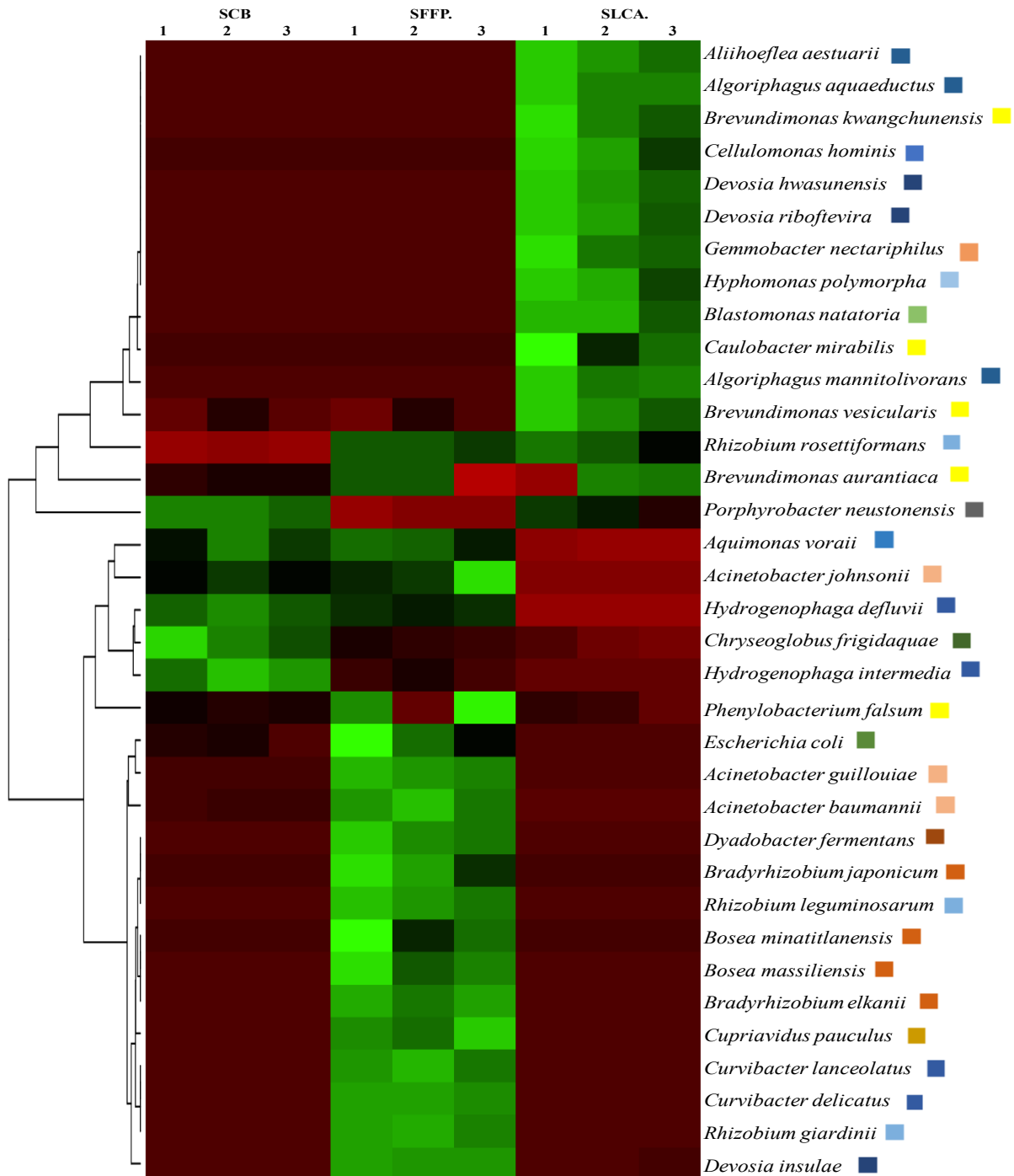
Para Ramanan *et al.* [35] e Sapp *et al.* [36], frequentemente as espécies que compõem a comunidade core em culturas de microalgas não são em grande parte micro-organismos fotossintéticos, e é provável que estas comunidades bacterianas tenham se adaptado e criado uma alta resistência a um número de fatores de estresse [37], e por essa razão é possível manter as conexões inerentes entre as algas e as bactérias sob condições adversas [24]. Em contraste, com os resultados obtidos no presente estudo, duas espécies do gênero *Brevundimonas* e uma do gênero *Porphyrobacter* foram encontradas formando parte da comunidade bacteriana core apresentado alta abundância relativa nos SFFP e SLCA. Segundo Tao; Rouvière; Cheng, [38], grande parte das bactérias do gênero *Brevundimonas* contém o pigmento astaxantina e bactérias do gênero *Porphyrobacter* é relatado possuir a capacidade de sintetizar bacterioclorofila em condições aeróbicas [39], por essa razão conseguem realizar processos fotossintéticos. Diferindo ao escrito por Ramanan *et al.* [35].

Figura 6 - Diagrama de Venn indicando a comunidade bacteriana core e comunidades únicas presente nos diferentes sistemas de cultivo da microalga *S. obliquus*.



A fim de comparar a distribuição taxonômica da comunidade bacteriana das nove amostras (três sistemas de cultivo, três réplicas), a abundância relativa normalizada das UTOs ao nível de espécie foi utilizada para gerar um *Heatmap* de distribuição (Fig. 7). Conforme a abundância relativa as UTOs foram classificadas como alta (> 10%), média (> 1% e <10%), e baixa (<1%). O *Heatmap* revelou uma estratificação das comunidades bacterianas em relação aos sistemas de cultivo: as bactérias únicas do SLCA estão localizadas na parte superior; na parte intermedia estão localizadas as bactérias que compõem uma possível comunidade core que, por conseguinte, pertencem ao SCB; e na parte inferior do gráfico estão as comunidades bacterianas correspondentes ao SFFP. As espécies de maior abundância foram *Porphyrobacter neustonensis* com abundância entre 38% e 40% no SCB, enquanto *Brevundimonas aurantiaca* apresentou abundância entre 20% e 50% no SFFP e, novamente, *Porphyrobacter neustonensis* com 22% a 48% no SLCA. Essas duas espécies apresentaram abundância entre 32% e 87% em todas os sistemas de cultivo.

Figura 7 - *Heatmap* espécies. Abundância relativa de espécies bacterianas associadas à cultura de microalgas. Classificando UTOs como abundância alta verde, abundância média preto, baixa abundância, vermelho e vinho (0%).



Obs.: Os quadrados localizados na frente de cada espécie são relativos às Famílias (Figura 5).

Em contraste, no presente estudo as bactérias em comuns foram *Brevundimonas* e *Rhizobium*. Cabe ressaltar que Krohn-Molt *et al.* [34] também encontraram bactérias do gênero *Brevundimonas*, sendo que, membros desses gêneros têm sido frequentemente isolados do solo

e de ambientes aquáticos. Existe a possibilidade de que bactérias do gênero *Brevundimonas* estejam sempre presentes como cepas bacterianas comumente registradas nas culturas de *S. obliquus*, independente do sistema de cultivo até mesmo no ambiente natural. Tao, Rouvière e Cheng [38] relatam que as bactérias do gênero *Brevundimonas* sintetizam astaxantina que é um pigmento de alto valor econômico na indústria e sua obtenção, a partir de outras fontes, está sendo ativamente explorada.

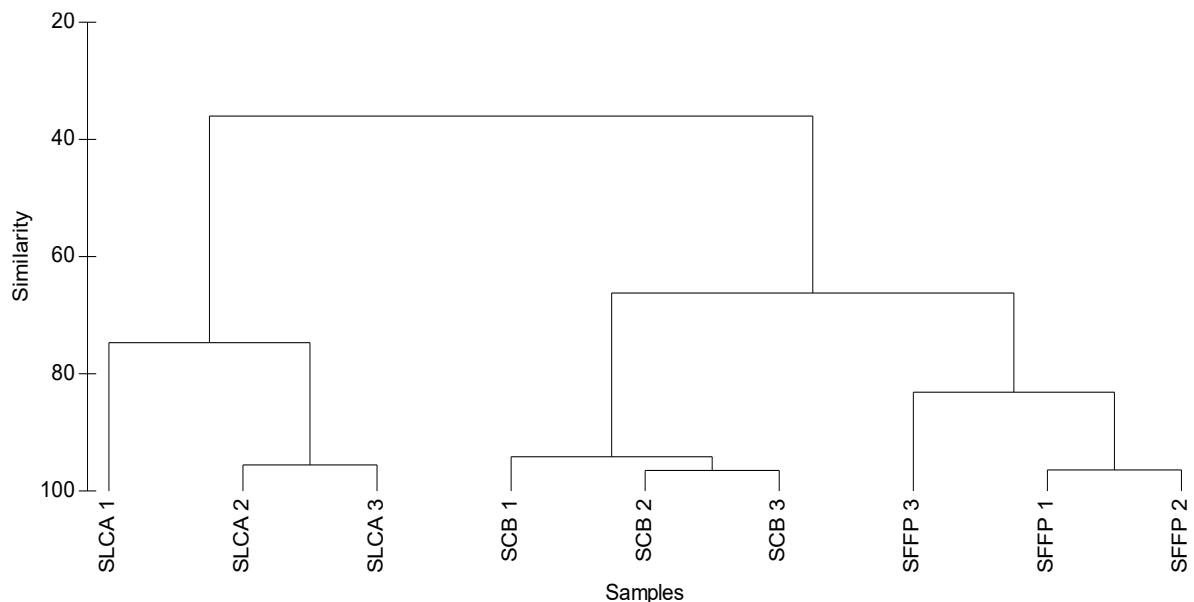
A astaxantina é frequentemente usada na aquicultura, sendo suplementado em dietas de salmonídeos principalmente para a pigmentação do tecido muscular, além de ser fundamental pela capacidade antioxidante. Os salmonídeos dos gêneros *Salmo*, *Oncorhynchus* e *Salvelinus* selvagens acumula carotenoides produzidos por algas transferidos através da cadeia alimentar, mas para salmonídeos criados em cativeiro esses carotenoides devem ser adicionados na como completo na ração [44,45]. Tao, Rouvière e Cheng [38] relatam que os genes de síntese de carotenoides identificados de *Brevundimonas* podem ser usados para a produção de astaxantina em outros micro-organismos através da engenharia genética. A microalga *S. obliquus* ao ser uma microalga com alto potencial biotecnológico principalmente pela rusticidade se adaptando as condições de cultivos superintensivos, atingindo uma elevada biomassa. Poderia ser um apropriado candidato para modificar seu DNA na produção do pigmento astaxantina, devido a que coabita com a bactéria *B. aurantiaca* sendo uma bactéria que apresenta uma alta abundância relativa e forma parte da comunidade core. Assim futuramente, poder empregar essa microalga como suplemento nas dietas nos cultivos de salmonídeos.

Liu *et al.* [43] investigaram o metabolismo de *P. neustonensis*, onde foi sequenciado o genoma completo para compreender os principais caminhos metabólicos em relação às formas de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo com base nos principais genes que processa. Embora essa bactéria tenha genes relacionados com a síntese de bacterioclorofila e possa sintetizar energia química a partir da energia luminosa, a ausência de fixação de carbono e de co-genes oxidantes indica que a cepa não é capaz crescer autotroficamente, pois somente consegue utilizar fontes carbono orgânico. Não há uma via de glicólise completa, mas processa genes-chave para as vias metabólicas pentose fosfato e no ciclo do ácido tricarboxílico. No presente estudo, *P. neustonensis* apresentou dominância nos sistemas SCB e SCLA estando presente em menor abundância no SFFP. Em um estudo com *Scenedesmus quadriculata*, onde foi desenvolvida uma caracterização metagenômica e uma análise de metatranscriptômica, Krohn-Molt *et al.* [25] relataram que *P. neustonensis* revelou uma alta expressão dos genes relativos às vias metabólicas relacionadas com a sínteses de cobalamina, sendo que essa vitamina é

importante como cofator da enzima metionina sintase dependente da cobalamina[44] associada a tolerância na mudança de temperatura, crescimento, entre outros fatores importantes na fisiologia das microalgas [15].

A análise de agrupamento hierárquico (UPGMA, coeficiente de similaridade de Bray-curtis) com base nas ocorrências de UTOs no nível taxonômico de espécie, baseado na presença-ausência das UTOs, indicou que as amostras SCB tinham uma semelhança perto do 90% entre as réplicas e em comparação ao SFFP foi mais semelhante agrupando-se com 69% de similaridade, que com o SLCA que foi o diferente, com 35% de semelhança com os sistemas de produção nos sistemas SCB e SFFP (Fig. 8).

Figura 8 - Análise de similaridade Bray-Curtis entre os três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB); Sistema Fotobiorreator tipo *flat panel* (SFFP); e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA).



Ao contrário da rizosfera das plantas, a formação e o tamanho da ficosfera de microalgas depende fortemente também das forças hidrodinâmicas no ambiente de cultivo [45]. Portanto, a estrutura das comunidades bacterianas deve ser determinada pelo regime hidrodinâmico durante cultivo das microalgas em um laboratório [24]. Nesse sentido, os sistemas SCB e SFFP tem condições de cultivo similares (cultivo *indoor*) em contraste com o SLCA que é um cultivo *outdoor*, cujo sistema é influenciado pelos fatores ambientais (luz e temperatura, por exemplo). Conforme Sánchez-Zurano *et al.* [23], nos cultivos de *S. obliquus* os parâmetros de cultivo influenciaram as flutuações na abundância das principais populações de bactérias detectadas e na atividade microalgal,

Particularmente no SLCA é onde se produz uma elevada Biomassa microalgal; obtida pela alta capacidade de contato das células microalgais com a energia luminosa no recorrido

pelo SLCA [4]. Cabe a possibilidade de relacionar com atividade alelopática que comumente é definida como um processo que envolve compostos químicos liberados no meio aquático, nesse caso pelas microalgas, referindo efeitos adversos, seja diretamente ou indiretamente, no crescimento de outros micro-organismos [46]. Cabe a possibilidade de ser uma das razões da diminuição na riqueza e diversidade, do SLCA que teoricamente deveria ser superior por ser um sistema *outdoor* [22].

2.4 CONCLUSÕES

No agrupamento das comunidades bacterianas foram encontrados três Filos, seis Classes, doze Ordens, vinte oito famílias e trinta e cinco espécies. As espécies *Brevundimonas aurantiaca* e *Porphyrobacter neustonensis* apresentaram maior abundância relativa em relação a outras espécies encontradas como *Aquimonas voraii*, *Hydrogenophaga intermedia*, *Phenylobacterium falsum*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseoglobus frigidaquae* e *Rhizobium rosettiforman*, sendo que essas espécies estiveram presentes em todos os sistemas de cultivo formando uma possível comunidade “core”. As comunidades bacterianas associadas aos diferentes sistemas de cultivo da microalga *S. obliquus* mostraram um aumento na riqueza e diversidade de espécies nos sistemas superintensivo e intensivo, sendo que no SFFP foi verificada uma maior riqueza destas comunidades bacterianas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos (mestrado junto ao PPGAQI/UFSC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- [1] M.A. Toyub, M.I. Miah, M.A.B. Habib, M.M. Rahman, Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media, Bangladesh J. Anim. Sci. 37 (2008) 86–93. <https://doi.org/10.3329/BJAS.V37I1.9874>
- [2] S. Mandal, N. Mallick, Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production., Appl. Microbiol. Biotechnol. 84 (2009) 281–291. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6>.

- [3] P.D. Álvarez-Díaz, J. Ruiz, Z. Arbib, J. Barragán, M.C. Garrido-Pérez, J.A. Perales, Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process, *Bioresour. Technol.* 181 (2015) 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.018>.
- [4] H.C. Venancio, H. Cella, R.G. Lopes, R.B. Derner, Surface-to-volume ratio influence on the growth of *Scenedesmus obliquus* in a thin-layer cascade system, *J. Appl. Phycol.* 32 (2020) 821–829. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02036-0>.
- [5] C.Y.B. Oliveira, T.L. Viegas, R.G. Lopes, H. Cella, R.S. Menezes, A.T. Soares, N.R. Antoniosi Filho, R.B. Derner, A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga *Scenedesmus obliquus*, *Biomass and Bioenergy.* 132 (2020) 105437. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105437>.(a)
- [6] C.Y.B. Oliveira, T.L. Viegas, M.F.O. da Silva, D.M. Fracalossi, R.G. Lopes, R.B. Derner, Effect of trace metals on growth performance and accumulation of lipids, proteins, and carbohydrates on the green microalga *Scenedesmus obliquus*, *Aquac. Int.* 28 (2020) 1435–1444. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00533-0>.(b)
- [7] T. DITTAMI, S. M.; EVEILLARD, D.; TONON, A metabolic approach to study algal–bacterial interactions in changing environments, *Mol. Ecol.* 23(7) (2014) 1656–1660. <https://doi.org/10.1111/mec.12670>.
- [8] E.F.Y. Hom, P. Aiyar, D. Schaeme, M. Mittag, S. Sasso, A chemical perspective on microalgal–microbial interactions, *Trends Plant Sci.* 20 (2015) 689–693. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2015.09.004>.
- [9] R. Ramanan, B.-H. Kim, D.-H. Cho, H.-M. Oh, H.-S. Kim, Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 14–29. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.12.003>.
- [10] S.A. Amin, M.S. Parker, E. V. Armbrust, Interactions between diatoms and bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (2012) 667–684. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00007-12>.
- [11] M. Wahl, F. Goecke, A. Labes, S. Dobretsov, F. Weinberger, The second skin: Ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00292>.
- [12] A. Danchin, S. Braham, Coenzyme B12 synthesis as a baseline to study metabolite contribution of animal microbiota, *Microb. Biotechnol.* 10 (2017) 688–701. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12722>.
- [13] J.B. Bruhn, L. Gram, R. Belas, Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 442–450. <https://doi.org/10.1128/AEM.02238-06>.
- [14] S.A. Amin, D.H. Green, M.C. Hart, F.C. Küpper, W.G. Sunda, C.J. Carrano, Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 17071–17076. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0905512106>.
- [15] B. Xie, S. Bishop, D. Stessman, D. Wright, M.H. Spalding, L.J. Halverson, *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B12 -producing bacteria, *ISME J.* 7 (2013) 1544–1555. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.43>.
- [16] S.M. Dittami, L. Duboscq-Bidot, M. Perennou, A. Gobet, E. Corre, C. Boyen, T. Tonon, Host-microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures, *ISME J.* 10 (2016) 51–63. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.104>.
- [17] S.A. Amin, L.R. Hmelo, H.M. van Tol, B.P. Durham, L.T. Carlson, K.R. Heal, R.L. Morales, C.T. Berthiaume, M.S. Parker, B. Djunaedi, A.E. Ingalls, M.R. Parsek, M.A. Moran, E. V Armbrust, Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria, *Nature.* 522 (2015) 98–101. <https://doi.org/10.1038/nature14488>.

- [18] J.A. Raymond, The ice-binding proteins of a snow alga, *Chloromonas brevispina*: probable acquisition by horizontal gene transfer, *Extremophiles*. 18 (2014) 987–994. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0668-3>.
- [19] G. Schönknecht, W.-H. Chen, C. Ternes, G. Barbier, R. Shrestha, M. Stanke, A. Bräutigam, B. Baker, J. Banfield, R. Garavito, K. Carr, C. Wilkerson, S. Rensing, D. Gagneul, N. Dickenson, C. Oesterhelt, M. Lercher, A. Weber, Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote, *Science*. 339 (2013) 1207–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1231707>.
- [20] P. Hugenholtz, A. Skarshewski, D.H. Parks, Genome-based microbial taxonomy coming of age, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 8 (2016). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018085>.
- [21] B. Yang, Y. Wang, P.-Y. Qian, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis, *BMC Bioinformatics*. 17 (2016) 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>.
- [22] E. Piampiano, F. Pini, N. Biondi, R. Pastorelli, L. Giovannetti, C. Viti, Analysis of microbiota in cultures of the green microalga *Tetraselmis suecica*, *Eur. J. Phycol.* 54 (2019) 497–508. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1606940>
- [23] A. Sánchez Zurano, J.A. Garrido Cárdenas, C. Gómez Serrano, M. Morales Amaral, F.G. Acién-Fernández, J.M. Fernández Sevilla, E. Molina Grima, Year-long assessment of a pilot-scale thin-layer reactor for microalgae wastewater treatment. Variation in the microalgae-bacteria consortium and the impact of environmental conditions, *Algal Res.* 50 (2020) 101983. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101983>.
- [24] A. Kublanovskaya, A. Solovchenko, T. Fedorenko, K. Chekanov, E. Lobakova, Natural Communities of carotenogenic Chlorophyte *Haematococcus lacustris* and bacteria from the white sea coastal rock ponds, *Microb. Ecol.* 79 (2020) 785–800. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01437-0>.
- [25] I. Krohn-Molt, M. Alawi, K.U. Förstner, A. Wiegandt, L. Burkhardt, D. Indenbirken, M. Thieß, A. Grundhoff, J. Kehr, A. Tholey, W.R. Streit, Insights into microalga and bacteria interactions of selected phycosphere biofilms using metagenomic, transcriptomic, and proteomic approaches, *Front. Microbiol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01941>.
- [26] F. de F. Neves, L. Hoinaski, L.R. Rörig, R.B. Derner, H. de Melo Lisboa, Carbon biofixation and lipid composition of an acidophilic microalga cultivated on treated wastewater supplied with different CO₂ levels., *Environ. Technol.* 40 (2019) 3308–3317. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1471103>.
- [27] A.P. Christoff, A.F.R. Sereia, D.R. Boberg, R.L. V Moraes, L.F. V Oliveira, Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing, *Neoprosp. Microbiome Technol.* 25 (2017).
- [28] X. Dong, M. Kleiner, C.E. Sharp, E. Thorson, C. Li, D. Liu, M. Strous, Fast and simple analysis of MiSeq amplicon sequencing data with MetaAmp, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01461>.
- [29] Y. Wang, P.-Y. Qian, Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies, *PLoS One*. 4 (2009) e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.
- [30] J.G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello,

- N. Fierer, A.G. Pena, J.K. Goodrich, J.I. Gordon, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*. 7 (2010) 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- [31] I. Illumina, 16S Metagenomic sequencing library preparation, *Prep. 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons Illumina MiSeq Syst.* (2013) 1–28.
- [32] S. Babicki, D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J.R. Grant, A. Maciejewski, D.S. Wishart, Heatmapper: web-enabled heat mapping for all., *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W147–53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
- [33] G.C.J. Abell, J.P. Bowman, Colonization and community dynamics of class Flavobacteria on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater, *FEMS Microbiol. Ecol.* 53 (2005) 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.008>.
- [34] I. Krohn-Molt, B. Wemheuer, M. Alawi, A. Poehlein, S. Güllert, C. Schmeisser, A. Pommerening-Röser, A. Grundhoff, R. Daniel, D. Hanelt, W.R. Streit, Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 6196–6206. <https://doi.org/10.1128/AEM.01641-13>.
- [35] R. Ramanan, Z. Kang, B.-H. Kim, D.-H. Cho, L. Jin, H.-M. Oh, H.-S. Kim, Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats, *Algal Res.* 8 (2015) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.003>.
- [36] M. Sapp, A.S. Schwaderer, K.H. Wiltshire, H.-G. Hoppe, G. Gerdt, A. Wichels, Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae?, *Microb. Ecol.* 53 (2007) 683–699. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9162-5>.
- [37] K. Chekanov, S. Vasilieva, A. Solovchenko, E. Lobakova, Reduction of photosynthetic apparatus plays a key role in survival of the microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) at freezing temperatures, *Photosynthetica*. 56 (2018) 1268–1277. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0841-5>.
- [38] L. Tao, P.E. Rouvière, Q. Cheng, A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine *Brevundimonas* that synthesizes hydroxylated astaxanthin., *Gene*. 379 (2006) 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.04.017>.
- [39] J.A. Fuerst, J.A. Hawkins, A. Holmes, L.I. Sly, C.J. Moore, E. Stackebrandt, *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., An aerobic bacteriochlorophyll-Synthesizing Budding Bacterium from Fresh Water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 43 (1993) 125–134. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-125>.
- [40] R. Wang, S. Xue, D. Zhang, Q. Zhang, S. Wen, D. Kong, C. Yan, W. Cong, Construction and characteristics of artificial consortia of *Scenedesmus obliquus*-bacteria for *S. obliquus* growth and lipid production, *Algal Res.* 12 (2015) 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.002>.
- [41] Q. Liu, Y.-H. Wu, H. Cheng, L. Xu, C.-S. Wang, X.-W. Xu, Complete genome sequence of bacteriochlorophyll-synthesizing bacterium *Porphyrobacter neustonensis* DSM 9434., *Stand. Genomic Sci.* 12 (2017) 32. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0243-5>.
- [42] M.T. Croft, A.D. Lawrence, E. Raux-Deery, M.J. Warren, A.G. Smith, Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria, *Nature*. 438 (2005) 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>.

- [43] J.R. Seymour, S.A. Amin, J.B. Raina, R. Stocker, Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships, *Nat. Microbiol.* 2 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>.
- [44] J.M. Martínez, Z. Gojkovic, L. Ferro, M. Maza, I. Álvarez, J. Raso, C. Funk, Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis*, *Bioresour. Technol.* 289 (2019) 121694. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121694>.
- [45] T. Ytrestøyl, S. Afanasyev, B. Ruyter, B. Hatlen, T.-K. Østbye, A. Krasnov, Transcriptome and functional responses to absence of astaxanthin in Atlantic salmon fed low marine diets, *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics.* 39 (2021) 100841. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100841>.
- [46] E.L. Rice, Allelopathy — An Overview BT - Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms, in: G.A. Cooper-Driver, T. Swain, E.E. Conn (Eds.), Springer US, Boston, MA, 1985: pp. 81–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9658-2_4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este um estudo inédito de caracterização bacteriana feita em diferentes sistemas de cultivo a partir de um único inóculo de *S. obliquus*, espécie que tem mostrado alto potencial biotecnológico em diversas aplicações. Com essa caracterização, foram identificadas oito espécies de bactérias que compõem a comunidade bacteriana core, sendo que estas poderão ser isoladas dependendo das particularidades de cada espécie, também da riqueza e dominância em relação ao sistema de cultivo, e poderão ser usadas em benefício das culturas da microalga *S. obliquus*, como micro-organismos com propriedades probióticas.

Em futuros trabalhos de *HTS* para a caracterização de outras microalgas, visando à redução dos (elevados) custos das análises, se recomenda suprimir as réplicas técnicas quando se tratar de sistemas fechados em frascos de vidro (SCB), uma vez que, na presente caracterização bacteriana, o número de leituras das espécies com abundâncias relativas maiores foi mantido na mesma proporção a respeito dos parâmetros de leitura gerados pelo sequenciamento.

Na comunidade core foram observadas as espécies *B. aurantiaca* e *P. neustonensis*, as quais podem ser candidatas a futuros estudos, uma vez que *B. aurantiaca* pode sintetizar o pigmento carotenoide astaxantina - pigmento altamente valorizado na indústria e na aquicultura - e, tendo em conta a proximidade dessa espécie em vários estudos de caracterização bacteriana, poderia se plantear a possibilidade de inserir esses de genes com o uso da engenharia genética, em *S. obliquus*, principalmente pela receptividade na transferência de genes horizontal que as microalgas possuem e *P. neustonensi* por já ter sequenciado o genoma e apresentar relação com a síntese de cobalamina que é uma vitamina importante na fisiologia da microalga em fatores como tolerância ao estresse, crescimento entre outros relatado em *S. quadriculata*.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D. *et al.* Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 90–96, 2015.
- AMIN, S. A. *et al.* Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 40, p. 17071–17076, 2009.
- AMIN, S. A. *et al.* Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. **Nature**, v. 522, n. 7554, p. 98–101, 2015.
- AMIN, S. A.; PARKER, M. S.; ARMBRUST, E. V. Interactions between diatoms and bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 667–684, 2012.
- BIONDI, N. *et al.* The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 67–78, 2017.
- BOWLER, C. *et al.* The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.
- BRUCKNER, C. G. *et al.* Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1052–1063, 2011.
- BRUHN, J. B.; GRAM, L.; BELAS, R. Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 442–450, 2007.
- CAI, L. *et al.* Biased diversity metrics revealed by bacterial 16s pyrotags derived from different primer sets. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53649, 2013.
- CARNEY, L.; SORENSEN, K. *Haematococcus pluvialis* culture compositions. **Google Patents**, 2016.
- CARNEY, L. T.; LANE, T. W. Parasites in algae mass culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–8, 2014.
- CHAKRAVORTY, S. *et al.* A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
- CHO, D.-H. *et al.* Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 578–585, 2015.

- CLARENS, A. F. *et al.* Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 5, p. 1813–1819, 2010.
- COOPER, M. B.; SMITH, A. G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. **Current Opinion in Plant Biology Elsevier Ltd**, 2015.
- DANCHIN, A.; BRAHAM, S. Coenzyme B12 synthesis as a baseline to study metabolite contribution of animal microbiota. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 688–701, 2017.
- DE ROY, K. *et al.* Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1472–1481, 2014.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.
- DITTAMI, S. M.; EVEILLARD, D.; TONON, T. A metabolic approach to study algal–bacterial interactions in changing environments. **Molecular Ecology**, v. 23(7), p. 1656–1660, 2014.
- DITTAMI, S. M. *et al.* Host-microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. **ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 51–63, 2016.
- FOFLONKER, F. *et al.* Genome of the halotolerant green alga *Picochlorum* sp. Reveals strategies for thriving under fluctuating environmental conditions. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 412–426, 2015.
- FULBRIGHT, S. P. *et al.* Bacterial community changes in an industrial algae production system. **Algal Research**, v. 31, p. 147–156, 2018.
- GARCÍA, D. *et al.* Comparative evaluation of piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors under indoor and outdoor conditions. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 483–490, 2017.
- GOHL, D. M. *et al.* Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 942, 2016.
- GRANT, M. A. A. *et al.* Direct exchange of vitamin B 12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial co-cultures. **ISME Journal**, v. 8, n. 7, p. 1418–1427, 2014.
- GROSSART, H. P.; SIMON, M. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 47, n. 2, p. 163–176, 2007.
- HERNANDEZ, J.-P. *et al.* Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 88–93, 2009.

HOM, E. F. Y. *et al.* A chemical perspective on microalgal–microbial interactions. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 11, p. 689–693, 2015.

HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; PARKS, D. H. Genome-based microbial taxonomy coming of age. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 6, p. a018085, 2016.

KEELING, P. J. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 583–607, 2013.

KERKHOF, L. J. *et al.* Profiling bacterial communities by MinION sequencing of ribosomal operons. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 116, 2017.

KIM, B.-H. *et al.* Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 95–105, 2014.

KONONOVA, S. V; NESMEYANOVA, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 184–195, 2002.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: methods and protocols. In: DNA Barcodes. **Humana Press, Totowa, NJ**, p. 3–8, 2012.

KROHN-MOLT, I. *et al.* Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial–algal interactions in photobioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 20, p. 6196–6206, 2013.

KUMAR, K. S. *et al.* Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 329–352, 2015.

LAKANIEMI, A. M. *et al.* Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 69–78, 2012.

LE CHEVANTON, M. *et al.* Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 212–222, 2013.

LI, Y. Inexpensive culturing of freshwater algae in a simulated warm environment using chicken manure medium. **Chalmers University of Technology**, 2011.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281–291, 2009.

MILLER, C. S. *et al.* Short-read assembly of full-length 16s amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56018, 2013.

MURDOCK, J. N.; WETZEL, D. L. FT-IR Microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. **Applied Spectroscopy**, v. 44, p. 335–361, 2009.

OLIVEIRA, C. Y. B. DE *et al.* A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105437, 2020a.

- OLIVEIRA, C. Y. B. *et al.* Effect of trace metals on growth performance and accumulation of lipids, proteins, and carbohydrates on the green microalga *Scenedesmus obliquus*. **Aquaculture International**, v. 28, n. 4, p. 1435–1444, 2020b.
- PARK, Y. *et al.* Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. **Hydrobiologia**, v. 598, n. 1, p. 219–228, 2008.
- PIAMPIANO, E. *et al.* Analysis of microbiota in cultures of the green microalga *Tetraselmis suecica*. **European Journal of Phycology**, v. 54, n. 3, p. 497–508, 2019.
- PUTT, R. *et al.* An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO₂ mass transfer. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3240–3245, 2011.
- RAMANAN, R. *et al.* Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 1, p. 14–29, 2016.
- RAYMOND, J. A. The ice-binding proteins of a snow alga, *Chloromonas brevispina*: probable acquisition by horizontal gene transfer. **Extremophiles: life under extreme conditions**, v. 18, n. 6, p. 987–994, 2014.
- RESHEF, L. *et al.* The coral probiotic hypothesis. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 12, p. 2068–2073, 2006.
- SAMBLES, C. *et al.* Metagenomic analysis of the complex microbial consortium associated with cultures of the oil-rich alga *Botryococcus braunii*. **Microbiology Open**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2017.
- SCHÖNKNECHT, G. *et al.* Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, p. 1207–1210, 2013.
- SCHRODA, M. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. **Photosynthesis Research**, v. 82, n. 3, p. 221–240, 2004.
- SEYMOUR, J. R. *et al.* Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 7 p. 1-12, 2017.
- SHIN, J. *et al.* Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- SILVERSTEIN, R. N.; CORREA, A. M. S.; BAKER, A. C. Specificity is rarely absolute in coral-algal symbiosis: implications for coral response to climate change. **Proceedings. Biological sciences**, v. 279, n. 1738, p. 2609–2618, 2012.
- SINGH, M.; DAS, K. C. Low-Cost Nutrients for Algae Cultivation: In *Algal Biorefineries*. **Springer, Dordrecht**, v. 1, p. 69–82.
- SOUTH, G. R.; WHITTICK, A. Introduction to phycology. **Blackwell Scientific**, viii, p 341, 1987.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. *et al.* Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 896–907, 2011.

SUN, L. *et al.* A novel membrane bioreactor inoculated with symbiotic sludge bacteria and algae: performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 311–319, 2018.

TANABE, Y. *et al.* A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.
TOYUB, M. A. *et al.* Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 86–93, 2008.

VENANCIO, H. C. *et al.* Surface-to-volume ratio influence on the growth of *Scenedesmus obliquus* in a thin-layer cascade system. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 2, p. 821–829, 2020.

WAHL, M. *et al.* The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–21, 2012.

WANG, H.-M. D. *et al.* Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource technology**, v. 184, p. 355–362, 2015.

WANG, S. *et al.* Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 303–309, 2014.

WATANABE, K. *et al.* Symbiotic association in *Chlorella* culture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 187–196, 2005.

XIE, B. *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B₁₂-producing bacteria. **ISME Journal**, v. 7, n. 8, p. 1544–1555, 2013.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

YANG, J. *et al.* Potential of wastewater treatment using a concentrated and suspended algal-bacterial consortium in a photo membrane bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 154–160, 2018.

ZHAO, G. *et al.* The importance of bacteria in promoting algal growth in eutrophic lakes with limited available phosphorus. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 107–111, 2012.

ZHU, Y. *et al.* Characterization of organic phosphorus in lake sediments by sequential fractionation and enzymatic hydrolysis. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 14, p. 7679–7687, 2013.

APÊNDICE A – Abundância relativa das espécies encontradas nos três sistemas de cultivo: Sistema de Cultivo de Bancada (SCB), Sistema Fotobiorreator tipo flat panel (SFFP) e Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA)

| | SCB | SCB | SCB | SFFP | SFFP | SFFP | SLCA | SLCA | SLCA |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0,03 | 0,05 | 0,06 | 0,53 | 0,67 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Acinetobacter guillouiae</i> | 0,11 | 0,09 | 0,08 | 2,26 | 2,05 | 3,26 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i> | 0,11 | 0,15 | 0,12 | 0,16 | 0,18 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Algoriphagus aquaeductus</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,84 | 1,42 | 1,60 |
| <i>Algoriphagus mannitolorans</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,80 | 0,38 | 0,45 |
| <i>Aliihoeflea aestuarii</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,65 | 0,35 | 0,32 |
| <i>Aquimonas voraii</i> | 3,41 | 5,36 | 4,51 | 5,86 | 5,98 | 7,45 | 1,19 | 0,46 | 0,63 |
| <i>Blastomonas natatoria</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,43 | 0,29 | 0,21 |
| <i>Bosea massiliensis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,16 | 0,09 | 0,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Bosea minatitanensis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,20 | 0,07 | 0,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | 0,10 | 0,22 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,28 | 0,23 | 0,20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Brevundimonas aurantiaca</i> | 29,22 | 31,84 | 34,12 | 54,99 | 57,03 | 23,21 | 24,76 | 58,28 | 65,29 |
| <i>Brevundimonas kwangchunensis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,22 | 0,10 | 0,09 |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i> | 0,04 | 0,09 | 0,05 | 0,03 | 0,11 | 0,12 | 0,52 | 0,28 | 0,26 |
| <i>Caulobacter mirabilis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | 0,03 | 0,06 |
| <i>Cellulomonas hominis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,69 | 0,38 | 0,23 |
| <i>Chryseoglobus frigidaquae</i> | 16,59 | 12,80 | 11,70 | 7,28 | 6,27 | 10,37 | 6,89 | 2,86 | 3,03 |
| <i>Cupriavidus pauculus</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,80 | 0,71 | 1,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Curvibacter delicatus</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,21 | 0,23 | 0,35 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Curvibacter lanceolatus</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,01 | 2,47 | 3,20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Devosia hwasunensis</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,77 | 0,98 | 0,86 |
| <i>Devosia insulae</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,41 | 0,41 | 0,68 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Devosia riboflavina</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,24 | 0,14 | 0,11 |
| <i>Dyadobacter fermentans</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,44 | 2,79 | 4,42 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0,09 | 0,09 | 0,10 | 0,78 | 0,47 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Gemmobacter nectariphilus</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,20 | 0,52 | 0,52 |
| <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | 6,46 | 7,38 | 6,69 | 5,87 | 5,48 | 8,44 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Hydrogenophaga intermedia</i> | 0,76 | 1,02 | 0,96 | 0,28 | 0,42 | 0,42 | 0,19 | 0,13 | 0,12 |
| <i>Hyphomonas polymorpha</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,33 | 0,81 | 0,52 |
| <i>Rhizobium giardinii</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,16 | 1,28 | 1,79 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,55 | 3,15 | 4,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Rhizobium rosetiformans</i> | 0,10 | 0,13 | 0,09 | 2,22 | 2,40 | 3,60 | 3,62 | 2,10 | 1,60 |
| <i>Phenylobacterium falsum</i> | 2,65 | 2,14 | 2,53 | 5,92 | 1,47 | 14,08 | 3,41 | 2,08 | 1,51 |
| <i>Porphyrobacter neustonensis</i> | 40,44 | 38,87 | 39,00 | 1,48 | 5,94 | 9,55 | 49,10 | 28,41 | 22,58 |