



Universidade de Aveiro  
2020

**Sandro Vieira Figueiredo**    **Caracterização de comunidades de bactérias endofíticas de**  
***Salicornia ramosissima* da Ria de Aveiro**



Universidade de Aveiro  
2020

**Sandro Vieira Figueiredo**    **Caracterização de comunidades de bactérias endofíticas de *Salicornia ramosissima* da Ria de Aveiro**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Isabel Natalia Sierra Garcia, Investigadora Doutorada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Rhizomis PTDC/BIA-MIC/29736/2017 financiado pela FCT através do Programa Operacional Regional do Centro (02/SAICT/2017) com fundos FEDER - Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, FNR e OE e teve apoio da FCT através do financiamento ao CESAM (UIDP/50017/2020 + UIDB/50017/2020)

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã pelo incansável apoio.

## **O júri**

<b>Presidente</b>	Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso Professora Auxiliar c/ Agregação, Universidade de Aveiro
<b>Vogal– Arguente</b>	Doutora Vanessa de Jesus Oliveira Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro
<b>Vogal – Orientadora</b>	Doutora Isabel Natália Sierra García Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

**Profª Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**, pela orientação, e oportunidade de trabalhar com este tema ao longo deste ano, Obrigada!

**Doutora Isabel Natália Sierra García**, pela co-orientação, pelo apoio e grande ajuda dentro e fora do laboratório, Obrigada!

**Doutora Carla Patinha**, pela ajuda com as análises químicas dos sedimentos, Obrigado!

**Vários membros do Departamento de biologia e CESAM**, por sempre se mostrarem disponíveis para ajudar e ensinar, Obrigada!

**Aos meus colegas de curso e amigos**, por tornarem este ano melhor e mais alegre, Obrigado!

**Aos meus pais, irmã e Paulo**, pelo incansável apoio, Obrigada!

## palavras-chave

Halófitas, microbiomas, bactérias endofíticas, sapal, sequenciação avançada

## resumo

As plantas halófitas sobrevivem em ambientes de elevada salinidade com recurso a várias estratégias, sendo uma delas, a associação com bactérias que contribuem para o seu crescimento e tolerância ao stresse. As bactérias que colonizam tecidos das plantas sem lhes causarem dano designam-se como endofíticas. O objetivo deste trabalho foi contribuir para uma melhor compreensão da relação entre a halófito *Salicornia ramosissima* e as comunidades de bactérias endofíticas associadas às suas raízes e a identificação de fatores bióticos e abióticos relevantes na estrutura e composição destas comunidades.

A riqueza, diversidade e composição das comunidades de bactérias endofíticas cultiváveis e não cultiváveis foi investigada em 3 locais da Ria de Aveiro, representativos de diferentes condições físico-químicas e graus de intervenção humana. A riqueza e diversidade de bactérias endofíticas de *S. ramosissima* avaliada por métodos dependentes e independentes de cultivo, foi maior em locais mais salinos. A abordagem dependente de cultivo permitiu obter uma coleção de isolados nos quais foram identificados representantes das classes Actinobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria e Bacilli. A abordagem independente de cultivo permitiu detetar a presença de 1 classe de Archaea (Candidatus Woeseearchaea) e 13 classes de Bactéria, com predomínio de  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacteroidia e Acidimicrobiia.

Os resultados demonstram a elevada diversidade e variabilidade das comunidades de bactérias endofíticas da raiz de *S. ramosissima*, bem como o efeito do hospedeiro e de fatores físico-químicos dos sedimentos na sua estrutura e composição .

**keywords**

Halophytes, microbiomes, endophytic bacteria, salt marsh, next-generation sequencing

**Abstract**

Halophytes survive in high salinity environments using several strategies, one of which is the association with bacteria that contribute to their growth and tolerance to stress. Bacteria that colonize plant tissues without causing damage are called endophytes. The aim of this work was to contribute to a better understanding of the relationship between the halophyte *Salicornia ramosissima* and the communities of endophytic bacteria associated with its roots and the identification of relevant biotic and abiotic factors as drivers of the structure and composition of these communities.

The endophytic bacterial richness, diversity and composition of the culturable and non-culturable fractions was investigated at three sites, within the estuarine system Ria de Aveiro, representing different physical-chemical conditions and degrees of human impact. The richness and diversity of *S. ramosissima* endophytic bacteria, as assessed either by culture dependent or culture-independent methods, was higher in the most saline sites. The culture-dependent approach provided a collection of isolates in which representatives of the classes Actinobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria and Bacilli were represented. The culture-independent approach, allowed the detection of 1 class of Archaea (Candidatus Woeseearchaea) and 13 classes of Bacteria, with a predominance of  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacteroidia and Acidimicrobiia. The results demonstrate the high diversity and variability of the communities of endophytic bacteria, as well as the effect of host-specific and sediment-specific factors on their structure and composition.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Fitobiomas .....	1
1.2. Bactérias endofíticas .....	3
1.3. Comunidades endofíticas de halófitas .....	5
1.4. A halófito Salicornia ramosissima na Ria de Aveiro .....	7
1.5. Objetivos.....	9
2. Materiais e métodos.....	10
2.1. Área de estudo .....	10
2.2. Colheita .....	10
2.3. Tratamento das amostras .....	12
2.3.1. Tratamento das amostras de plantas .....	12
2.3.2. Tratamento das amostras de de sedimento e água intersticial .....	12
2.4. Caracterização da fracção cultivável .....	14
2.4.1. Isolamento de bactérias endofíticas da raiz .....	14
2.4.2. Tipagem dos isolados por BOX-PCR.....	14
2.4.3. Extração de DNA genómico dos isolados bacterianos endofíticos .....	15
2.4.4. Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciação.....	15
2.4.5. Identificação dos isolados endofíticos.....	16
2.5. Caracterização da fracção cultivável .....	17
2.5.1. Extração de DNA total de e amplificação por PCR.....	17
2.5.2. Análise por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) .....	17
2.5.3. Sequenciação de nova geração .....	18
2.5.4. Análises de dados do sequenciamento de nova geração.....	18
3. Resultados/Discussão .....	20
3.1. Caracterização do ambiente sedimentar .....	20
3.2. Identificação de isolados de bactérias endofíticas .....	22
3.3. Análise da diversidade de bactérias endofíticas isoladas.....	26
3.4. Análise das comunidades totais .....	28
3.4.1. Comparação da estrutura das comunidades por DGGE .....	28
3.4.2. Sequenciação Illumina .....	30
3.4.3. Comunidades versus isolados: relação com fatores físico-químicos.....	41
4. Conclusão .....	43
5. Referências .....	44
Anexos.....	55



# 1. Introdução

## 1.1. Fitobiomas

Fitobioma é a designação atribuída à entidade biológica constituída pela planta e pelo seu contexto ecológico, incluindo os fatores ambientais e as comunidades de macro e microrganismos associadas, que em conjunto, influenciam a saúde e produtividade das plantas. Os organismos associados incluem representantes de todas as formas de vida: vírus, bactérias, archaea, fungos, outras plantas e animais. As interações biológicas entre esses organismos abrangem a gama de relações bióticas representada nos ecossistemas complexos, incluindo competição, predação e patogênese, mutualismo e simbiose. As interações biológicas são enquadradas por fatores ambientais, incluindo composição do solo, temperatura, humidade, irradiação e vento<sup>1</sup>.

A complexidade das interações que ocorrem dentro dos fitobiomas tem sido progressivamente desvendada à medida que são reportados resultados de estudos sobre estimativas da composição, e distribuição e abundância de organismos e genes nas comunidades microbianas associadas a plantas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Estimativa da abundância, diversidade e número de genes das comunidades presentes no fitobioma (adaptado de Leach et al., 2017)<sup>1</sup>

Grupo	Subterrâneo			Aéreo		
	Abundância	Diversidade	Nº de genes	Abundância	Diversidade	Nº de genes
Bactérias (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>12</sup>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>12</sup>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>7</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>
Fungos (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>8</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>3</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>
Archaea (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>5</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	1 – 10	10 <sup>5</sup>
Vírus (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>	1 – 50	10 <sup>5</sup>
Fungos (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	10 <sup>9</sup>			
Algas (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>5</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>	10 <sup>10</sup>			
Nemátodos (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>2</sup>	10 <sup>0</sup> – 10 <sup>1</sup>	10 <sup>6</sup>			
Artrópodes (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>3</sup>	10 <sup>8</sup>			
Anelídeos (g <sup>-1</sup> amostra)	10 <sup>1</sup> – 10 <sup>3</sup> m <sup>-2</sup>	10 – 15 ha <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> m <sup>-2</sup>			

Décadas de investigação têm demonstrado a importância dos microrganismos na saúde e crescimento das plantas. Assim, as plantas são consideradas como um holobionte constituído pelo organismo hospedeiro e o seu microbiota<sup>2</sup>. Uma fração do microbiota das plantas, corresponde a microrganismos que colonizam o interior de tecidos e órgãos sem lhes causarem dano, designados como endofíticos<sup>3</sup>. As plantas e o microbiota interagem e influenciam-se mutuamente, sendo as interações estabelecidas e reguladas, através da produção e percepção de estímulos físicos e químicos.

A metataxonómica - termo recentemente proposto para designar as estratégias de sequenciação em grande escala para a caracterização e análise comparativa de microbiomas e compreensão das relações bióticas associadas<sup>4</sup> e os estudos de sequenciação do metagenoma (conjunto de genomas), têm levado à descoberta de que as bactérias estão representadas em todos os compartimentos da planta e de que o genótipo da planta, o compartimento (e.g. espermosfera, endosfera, rizosfera, filosfera) e o ambiente influenciam a estrutura e composição destas comunidades<sup>5</sup>.

Quando várias gerações de uma planta de crescimento rápido são estudadas, em conjunto com o seu microbioma, novas formas de interação podem ser observadas, reforçando a compreensão da forma como a interação entre plantas e microrganismos molda o desenvolvimento das primeiras<sup>6</sup>. Ao aumentar o acesso a nutrientes, ativar processos metabólicos, vias bioquímicas e mecanismos de defesa, o microbioma da planta pode aumentar ou diminuir a vantagem adaptativa à co-existência de espécies e, conseqüentemente, influenciar não apenas uma única espécie de planta, mas todo o ecossistema<sup>7</sup>.

A montagem do microbioma da planta pode iniciar-se na fase da produção da semente, envolvendo o recrutamento de microrganismos a partir de diversas fontes, das quais se destaca o solo, por interação das sementes com o ambiente circundante<sup>8</sup>. As plantas podem adquirir uma diversidade de microrganismos ao longo de todos os estágios do seu ciclo de vida de forma que as comunidades são mutáveis, com constante aquisição e perda de elementos<sup>9</sup>. Fatores como a espécie da planta, o estágio de desenvolvimento e o compartimento da planta também tem um papel importante na definição de diferentes associações microbianas<sup>8</sup>. Na rizosfera, além da espécie de planta, a composição e a

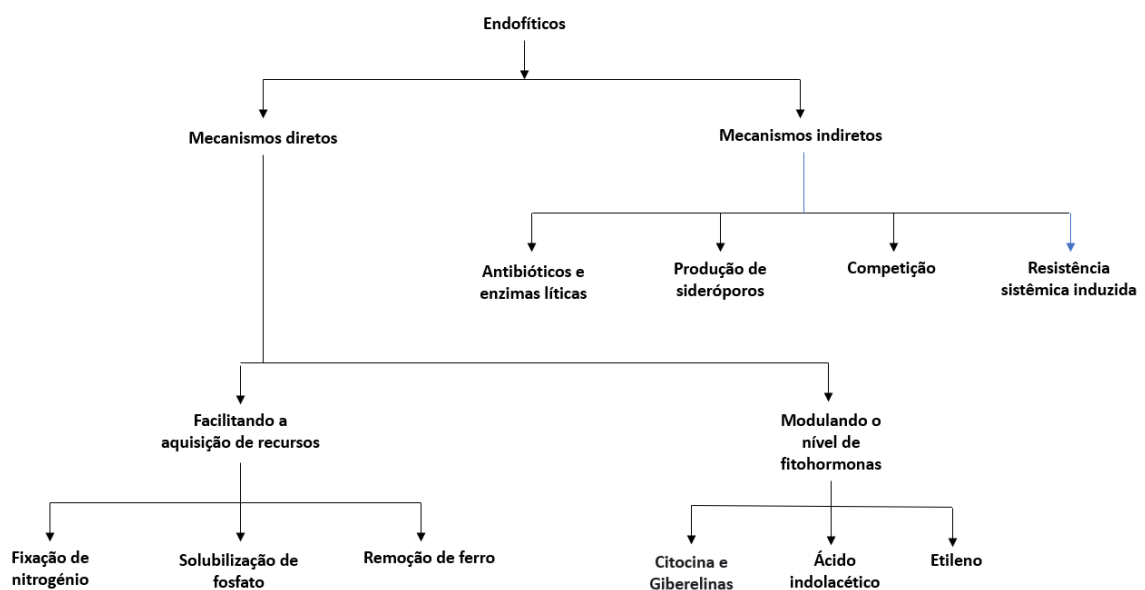
diversidade das comunidades microbianas são moldadas pelo tipo de solo, pedoclima, fatores climáticos e sazonais, condição das plantas, estágio de desenvolvimento, tratamentos com pesticidas, micro e macrofauna, e vários outros fatores bióticos e abióticos<sup>10</sup>. Coloca-se assim, a hipótese de que tenha ocorrido coevolução das plantas e de alguns constituintes do seu microbioma<sup>9</sup>. Apesar de ser frequente na literatura sobre microbiomas, uma aceção ampla do termo 'coevolução', numa perspetiva rigorosa, a coevolução entre os hospedeiros e seus microbiomas ocorre apenas sob condições restritas uma vez que requer modificação genética recíproca de ambos os parceiros<sup>9</sup>.

## **1.2. Bactérias endofíticas**

Endofíticos são microrganismos comensais ou mutualistas, que podem ser isolados de tecidos superficiais de plantas cuja superfície foi desinfetada, ou extraídas de dentro da planta<sup>10,11</sup>. Podem ser encontrados em vários órgãos, como raízes, caules, folhas, frutos e flores<sup>10</sup>. A colonização ocorre normalmente por penetração na raiz, de bactérias da rizosfera (rizobacterias). No entanto, alguns microrganismos endofíticos podem ser transmitidos através da semente ou penetrar através de tecidos foliares danificados<sup>12</sup>. Durante a transição da rizosfera para a endosfera, ou seja, a mudança de habitat do sedimento circundante da raiz para os tecidos internos da planta, estas bactérias foram capazes de uma adaptação rápida a um novo ambiente, e às variações de pH e pressão osmótica. Os mecanismos de reconhecimento e adaptação envolvem recetores moleculares, mobilidade, capacidade de penetração e capacidade de ajuste do metabolismo e taxas de atividade<sup>13</sup>. A distribuição de bactérias endofíticas está intimamente relacionada com a fisiologia da planta e as condições ambientais. As maiores densidades ocorrem na raiz havendo diminuição progressiva de abundância em caules e folhas<sup>14</sup>.

Estas associações entre plantas e bactérias endofíticas podem ser facultativas ou obrigatórias para o hospedeiro, dependendo do genótipo da planta e da sua estratégia de vida. As bactérias endofíticas obrigatórias podem ser transmitidas entre gerações através de sementes ou tecidos vegetais<sup>13</sup>. Estas bactérias, podem colonizar os tecidos internos, desenvolvendo diferentes estilos de vida e de interação com o hospedeiro, incluindo

relações simbióticas como mutualismo e comensalismo<sup>14</sup>. Bactérias endofíticas benéficas também conhecidas como bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas (PGPB) mostram capacidade de estimular o crescimento da planta e/ou sua capacidade de resistir ao stresse ambiental e a infeções, e reduzir os sintomas da doença<sup>10,16</sup>. Muitas destas características são comuns às rizobactérias, mas os efeitos benéficos proporcionados pelas bactérias endofíticas são geralmente maiores do que os oferecidos pela maior parte das bactérias rizosféricas<sup>12</sup>.

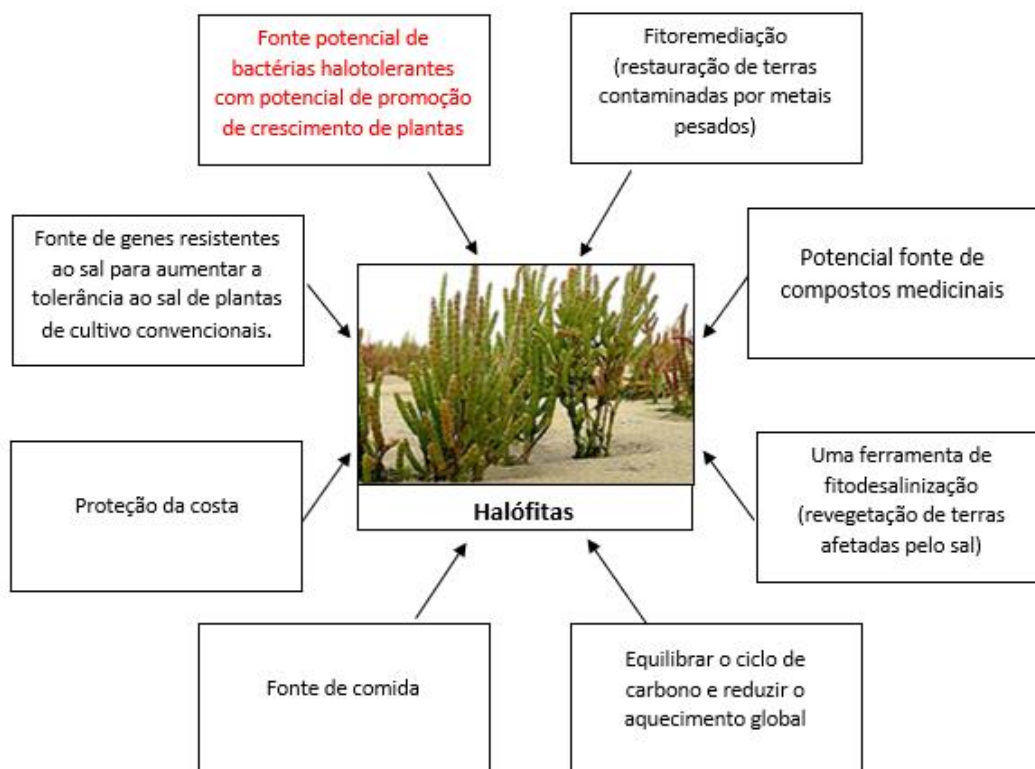


**Figura 1** - Mecanismos adotados por bactérias endofíticas para promover o crescimento das plantas<sup>16</sup>.

Os PGPBs usam uma variedade de mecanismos para promover o crescimento das plantas (Figura 1). Alguns desses mecanismos consistem na produção de fito-hormonas indutoras de crescimento de plantas, como ácido acético (IAA), giberelinas e auxinas ou representam estímulos indiretos por meio das suas variadas atividades metabólicas de libertação de nutrientes, como a fixação de nitrogénio (N<sub>2</sub>) e solubilização de fosfato (P)<sup>11,16</sup>.

### 1.3. Comunidades endofíticas de halófitas

A tolerância à salinidade varia entre as diversas espécies de plantas e com base nesse critério, as plantas são classificadas como glicófitas (plantas sensíveis ao sal) ou halófitas (plantas com afinidade com sal)<sup>17</sup>. As halófitas sobrevivem e conseguem completar o seu ciclo de vida em ambientes com elevadas concentrações de sal, podendo tolerar até 1 M NaCl<sup>18</sup>. A concentração ótima de cloreto de sódio (NaCl) para o crescimento da maioria das halófitas em soluções de cultura, varia de 20 a 500 mmol L<sup>-1</sup>, embora os valores ótimos possam variar com o estado fenológico e idade da planta e com as condições ambientais<sup>19</sup>.



**Figura 2** – Potenciais usos de halófitas, com destaque para o seu potencial enquanto fonte de bactérias halotolerantes (adaptado de Etesami & Beattie, 2018)<sup>17</sup>.

As mudanças climáticas e a salinização do solo são dois dos maiores problemas que ameaçam a conservação dos ecossistemas<sup>17</sup>. De entre as principais atividades económicas, prevê-se que seja a produção agrícola a mais severamente afetada por estas mudanças.

Nesse sentido, as espécies halófitas têm sido propostas como alternativas às culturas tradicionais, na perspectiva da recuperação para a prática agrícola de solos salinizados ou do uso de água salobra para irrigação<sup>20</sup>. Estas plantas apresentam mecanismos de tolerância ao stress ambiental, alta produtividade e valores nutricionais excepcionais<sup>20</sup> (Figura 2).

As plantas halófitas operam vários mecanismos, primários e secundários, para lidar com a salinidade elevada. Os mecanismos primários incluem o ajuste osmótico, a exclusão de Na da célula ou tecido vegetal ou o isolamento do sódio no vacúolo. Os mecanismos secundários envolvem microrganismos que melhoram o crescimento da planta, particularmente sob condições de stress<sup>15</sup>.

Uma vez que o microbioma está envolvido direta ou indiretamente na regulação do crescimento de qualquer planta, tem vindo a ser cada vez mais aceite que os mecanismos de adaptação das plantas halófitas à salinidade estão também relacionados com microrganismos endofíticos e rizosféricos halotolerantes altamente especializados<sup>15</sup>. Em geral, é observada maior abundância e atividade metabólica da comunidade endofítica em plantas expostas a salinidades mais elevadas<sup>22</sup> o que constitui uma evidência indireta da contribuição das bactérias endofíticas para a adaptação das plantas ao stresse salino.

Para além da sua tolerância a solos salinos as colocar como potenciais culturas agrícolas e fontes de alimento, as plantas halófitas tem também capacidade para eliminar compostos orgânicos e remover elementos tóxicos como o Se, Pb, Cr, Zn e As, apresentando assim elevado interesse como agentes de fitorremediação<sup>23</sup>. Assim, para além de contribuir para a tolerância ao sal, a relação planta-endófitos está também subjacente ao sucesso de algumas halófitas como agentes de fitorremediação de solos, nomeadamente em caso de contaminação com metais<sup>13</sup>. As bactérias endofíticas desenvolvem vários tipos de mecanismos, através dos quais aliviam a toxicidade de iões metálicos. Esses mecanismos incluem a transformação de iões metálicos em formas menos tóxicas, o sequestro de metais na superfície celular ou em polímeros intracelulares, entre outros<sup>14</sup>.

Antes da massificação do uso da sequenciação avançada em ecologia microbiana, as bactérias endofíticas foram estudadas principalmente usando métodos baseados em

cultivo<sup>22</sup>. Os estudos mais recentes, baseados em métodos moleculares revelam um cenário completamente diferente no qual as comunidades de endofíticas revelam ser muito mais diversas do que aquelas que se consegue cultivar em laboratórios<sup>22</sup>.

Embora ainda escassos, têm sido realizados trabalhos dirigidos ao estudo das comunidades bacterianas associadas a plantas halófitas. Estes estudos, têm aplicado a plataforma de sequenciação Illumina para obter informação mais abrangente sobre a estrutura e composição e abundância destas comunidades. A análise das comunidades de endofíticas associadas às halófitas *Glaux marítima* e *Salicornia europaea* baseada em sequenciação na plataforma Illumina MiSeq, revelou que as comunidades associadas às duas plantas, embora estruturalmente distintas, eram dominadas pelos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes e Chloroflexi<sup>24</sup>. Um outro estudo, envolvendo a caracterização do microbioma de diferentes compartimentos (folhas, caule, raiz, solo de rizosfera e solo de controlo) do fitobioma da halófito *Messerschmidia sibirica*, por sequenciação das regiões hipervariáveis V5-V7 do gene 16S rRNA bacteriano usando o Illumina HiSeq, mostrou que os 35 géneros mais representados pertenciam aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Os géneros mais representados foram *Rhizobium* ( $\alpha$ -Proteobacteria), *Streptomyces* (Actinobacteria) e *Pseudomonas* ( $\gamma$ -Proteobacteria). A estrutura das comunidades variou entre compartimentos, sendo as comunidades encontradas na raiz, mais diversas do que as das folhas ou caules<sup>25</sup>. Um estudo análogo, realizado em *Limonium sinense*, identificou um total de 23 filos diferentes, com predominância de Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Gemmatimonadetes e Proteobacteria<sup>26</sup>.

#### **1.4. A halófito *Salicornia ramosissima* na Ria de Aveiro**

*Salicornia* é um género de halófito anual da família *Chenopodiaceae* descrita como pioneira, ou seja, das primeiras a colonizar ambientes intertidais ou salinos (Figura 3). O caule principal e os seus ramos opostos são compostos por ramos curtos, cada um com uma cobertura fotossintética suculenta, que lhe conferem o aspeto articulado característico. Na maturidade, cada ramo termina numa ponta carnuda de segmentos

férteis contíguos. A parte aérea chega a ter 40 cm, com caules simples ou ramificados, com tonalidade verde escura que se torna vermelha a púrpura. O sistema radicular tende a ser superficial, frequentemente penetrando menos de 10 – 20 cm no sedimento<sup>27</sup>. Estas plantas crescem em habitats costeiros ou interiores periodicamente inundados e salinos, distribuídos por regiões temperadas e subtropicais, com exceção da América do Sul e Austrália<sup>23,28</sup>.



**Figura 3** – Banco de *Salicornia ramosissima*.

*Salicornia ramosissima* é a única espécie representada em Portugal, é interessante notar que o nome *Salicornia* tem origem na palavra latina que significa "sal". Estudos relatam que algumas espécies, como *Salicornia europaea*, mostram tolerância a salinidade até 3% NaCl<sup>29</sup>. Por ser salgada, succulenta e com textura estaladiça, esta planta é apreciada em saladas, sendo que em algumas culturas, é mesmo considerado uma iguaria. Apenas as partes verdes e tenras são recomendadas para a alimentação, sendo as avermelhadas demasiado ricas em NaCl e Si. Além dessa relevância agrícola e económica, algumas espécies de *Salicornia* têm várias aplicações na medicina tradicional, como tratamento de obesidade, nefropatia e cancro, e tem demonstrado experimentalmente exibir diversas atividades biológicas<sup>29,30</sup>.

*Salicornia ramosissima* está bem representada em sapais da Ria de Aveiro, esta Ria é um sistema estuarino caracterizado por uma reduzida profundidade média (< 1m). Como em vários outros sistemas costeiros do mundo, a intrusão de água salgada superficial em campos agrícolas circundantes faz com que a *S. ramosissima* surja espontaneamente em áreas antigamente agrícolas, pelo que o cultivo esta halófita pode vir a ser usado para mitigar as perdas associadas à salinização de terras aráveis<sup>30</sup>.



## 1.5. Objetivos

O objetivo deste trabalho é contribuir para uma melhor compreensão da relação entre a planta halófila *Salicornia ramosissima* e as comunidades de bactérias endofíticas associadas às suas raízes e a identificação de fatores bióticos e abióticos relevantes na estrutura e composição destas comunidades. Para este efeito foram utilizados métodos dependentes e independentes de cultivo, permitindo assim também avaliar a representatividade da abordagem dependente de cultivo face aos resultados da sequenciação avançada.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Área de estudo

A Ria de Aveiro é um sistema estuarino de topografia complexa, localizado na costa noroeste de Portugal (Figura 4). Tem 45 km de comprimento e 10 km de largura e cobre uma área de 83 km<sup>2</sup> na maré alta, que se reduz para 66 km<sup>2</sup> na maré baixa. É caracterizada por canais estreitos, bancos de lodo e sapais<sup>31</sup>. A Ria de Aveiro é uma laguna pouco profunda (profundidade média de 1 m). As áreas mais profundas da lagoa estão confinadas ao canal de entrada e a pequenas áreas próximas da embocadura, no limite oeste da laguna. Nessas áreas, a profundidade pode ser da ordem ou superior a 10 m<sup>32</sup>. Como em vários outros sistemas costeiros do mundo, a intrusão de água salgada superficial atinge os campos agrícolas circundantes<sup>30</sup>.

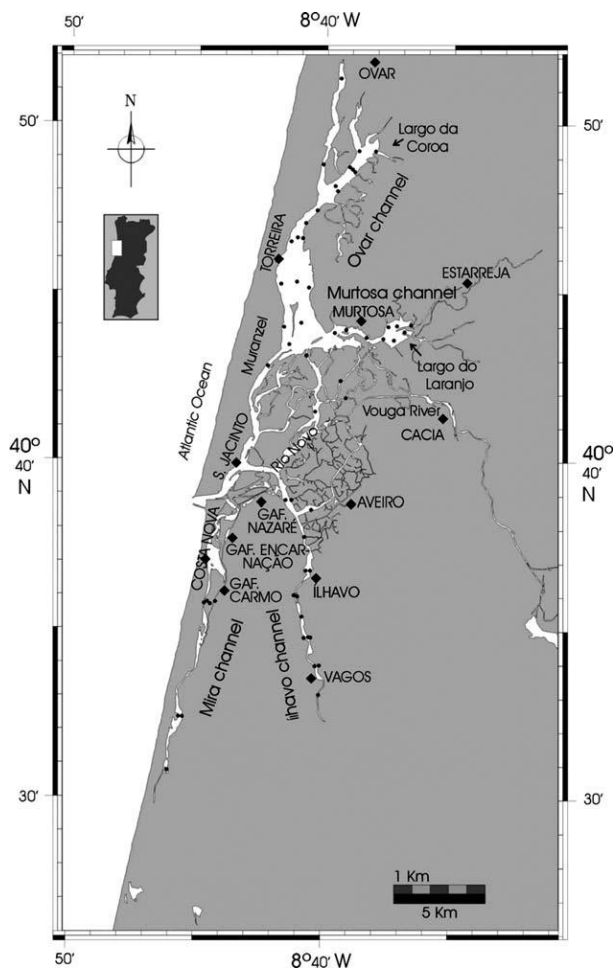


Figura 4 – Mapa localização da Ria de Aveiro.

### 2.2. Colheita

A recolha de amostras de plantas, sedimentos e água intersticial foi efetuada em três locais distintos da ria de Aveiro representando diferentes condições de salinidade e tipo de usos do solo (Tabela 2). O local designado por “Santiago” corresponde à marinha de sal (salina) de Santiago da fonte, detida pela Universidade de Aveiro, onde se mantém ativa a produção de sal tradicional. Neste local, *S. ramosissima* cresce naturalmente nas margens elevadas dos tanques. O local “Horta” corresponde a um local onde outrora existiram marinhas de sal e mais tarde, tanques de aquacultura. Atualmente pratica-se o

cultivo *S. ramosissima* para comercialização, pela empresa “Horta dos Peixinhos”. O local “Boco” corresponde a um sapal natural, numa zona de baixa salinidade, na extremidade do Canal de Ílhavo, onde *S. ramosissima* e outras halófitas crescem espontaneamente.

Em cada local, a colheita de plantas, sedimentos e água intersticial foi em 3 pontos separados por cerca de 10 m. As amostras de sedimento e água intersticial obtidas em nos diferentes pontos de cada local, foram combinadas numa amostra composta.

**Tabela 2** - Informação dos locais de colheita amostrados neste estudo na Ria de Aveiro

Local	Coordenadas geográficas	Data	Material colhido	Uso do solo
<b>Santiago da Fonte (Santiago)</b>	40°37'42''N 8°39'44''W	11/ 10/19	Plantas, sedimento, água intersticial	Salina
<b>Horta dos Peixinhos (Horta)</b>	40°32'24''N 8°40'16''W	16/10/19	Plantas, sedimento, água intersticial	Agricultura
<b>Boco</b>	40°39'2''N 8°38'42''W	25/10/ 19	Plantas, sedimento, água intersticial	Selvagem

As plantas em fase de pré-floração, foram recolhidas com ajuda de uma pá estéril retirando a totalidade da planta (raízes e parte aérea) e solo aderente às raízes. As plantas foram transportadas em sacos estéreis devidamente identificados. A colheita do sedimento foi realizada junto às plantas, em zonas de sedimento não colonizado. Os sedimentos foram colhidos com uma pá estéril e mantidos em sacos estéreis de polietileno isentos de metais pesados, bem vedadas durante o transporte do campo ao laboratório. A água intersticial foi extraída do solo onde as plantas tinham sido retiradas utilizando o sistema *Rhizon samplers* (Rhizosphere Research Products, Wageningen, The Netherlands) que consiste numa seringa acoplada a um filtro, através da qual se aplica pressão de sucção para obter a água à qual as raízes das plantas tem acesso direto. As amostras foram mantidas a 4 °C até à análise.

As plantas foram processadas no dia da colheita, ou no máximo, durante as 24 horas seguintes. As amostras de sedimento e água intersticial foram tratadas nas 48-72 horas subsequentes à colheita.

## **2.3. Tratamento das amostras**

### **2.3.1. Tratamento das amostras de plantas**

Com o intuito de estudar a comunidade endofítica das raízes, o solo aderente às raízes foi removido através de lavagens sucessivas. As raízes foram separadas da parte aérea e procedeu-se à sua limpeza e desinfecção. Foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) contendo 35 mL de tampão fosfato (PBS) e tween-80 (0.01 %) <sup>33</sup> e agitadas durante 30 min a 180 rpm. Posteriormente, foram transferidas para outro tubo com 40 mL de PBS e agitadas no vortex durante 5 minutos. Este procedimento de lavagem em PBS e agitação em vortex foi repetido 2 ou 3 vezes até se apresentarem visualmente limpas, sem partículas de sedimento. Para a esterilização da superfície, as raízes foram imersas em 40 mL de uma solução de peróxido de hidrogénio 15 % e agitadas 5 minutos no vortex <sup>34</sup>. De seguida, foram realizadas 3 lavagens sucessivas das raízes em PBS, com agitação no vortex por 2 minutos. Após a última lavagem, retirou-se 100 µL do PBS usado, para controlo de contaminação. O líquido foi semeado em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi). As culturas foram incubadas a 30 °C durante 3 dias para detetar a formação de colónias. As raízes esterilizadas foram utilizadas para os procedimentos subsequentes, relacionados com as técnicas dependentes e independentes de cultivo. Para as análises dependentes de cultivo, as raízes foram usadas de imediato. Para as análises independentes de cultivo, as raízes foram armazenadas a -80 °C até se proceder à extração de DNA.

### **2.3.2. Tratamento das amostras de de sedimento e água intersticial**

As amostras de sedimento foram colocadas em bandejas numa estufa a 50 °C, durante 5 dias, para a remoção da humidade residual. Após a secagem dos sedimentos, a sua desagregação física foi feita com o auxílio de martelos, e posteriormente todos esses

sedimentos foram peneirados, sendo usada para as análises a fração <2 mm. O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado pela perda por ignição (LOI)<sup>35</sup> após secagem em estufa a 110 °C overnight. As amostras foram arrefecidas num excicador, e pesadas antes de serem aquecidas a 430 °C durante 16h, numa mufla. Após a combustão, as amostras foram arrefecidas e pesadas novamente. O pH dos sedimentos foi determinado tanto em água, como em soluções de CaCl<sub>2</sub> (0,01 M) com base no método ISO 103090/2005 (ISO 2005). Para sedimentos, a relação entre massa e volume de solução utilizada foi de 1:5 (5 g de solo e 25 mL de água ou solução de CaCl<sub>2</sub>). As suspensões foram agitadas durante 10 minutos e depois deixadas em repouso durante 24 horas. A medição foi realizada com medidor de pH Hanna Instruments HI 9025. Para determinar o valor da condutividade elétrica (EC), foi preparada uma mistura 1:2 (10 g de solo e 20 mL de água) e agitada durante 1 minuto. A mistura foi deixada em repouso durante 1 hora antes das medições com um condutímetro Hanna Instruments HI 9033. Na água intersticial, o pH e a condutividade elétrica foram determinados diretamente numa alíquota de 40 ml.

Os catiões de troca sódio (Na<sup>+</sup>), cálcio (Ca<sup>+2</sup>), magnésio (Mg<sup>+2</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) foram determinados em extratos de acetato de amónia (1M; pH = 7) usando espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-EM). A taxa de absorção de sódio (SAR) e a percentagem de sódio com capacidade de troca (ESP) foram determinados seguindo a diretriz para avaliação de salinidade do Programa Conjunto FAO/IAEA<sup>36</sup>. EC do extrato de saturação do solo (EC<sub>e</sub>) foram derivados dos valores de EC usando o fator de conversão descrito em Sonmez et al (2008)<sup>37</sup> para solo argiloso da Turquia.

Os sedimentos (0,25 g) foram digeridos com uma mistura de ácido quente (95 °C) (HClO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>-HCl-HF) e analisadas por ICP-MS para determinar as concentrações totais de 41 elementos no Laboratório Analítico ACME (ISO 9002 Accredited Co). Todos os reagentes utilizados eram de alta qualidade e os equipamentos utilizados para a determinação dos parâmetros foram previamente calibrados. Amostras replicadas também foram analisadas para avaliar a precisão das diferentes medições. As réplicas mostraram uma diferença percentual relativa (RPD) inferior a 10%.

## **2.4. Caracterização da fracção cultivável**

### **2.4.1. Isolamento de bactérias endofíticas da raiz**

Aproximadamente 0,3-0,5 g de raízes esterilizadas conforme descrito em 2.3.1 foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 3 cm e homogeneizadas num almofariz estéril com 10 mL de PBS estéril, sob condições assépticas. Um grama do material obtido foi usada como amostra inicial para a preparação de uma série de diluições decimais em PBS. As diluições foram semeadas por incorporação em TSA suplementado com NaCl (25 g L<sup>-1</sup>) para obter bactérias halotolerantes. As culturas foram incubadas a 28 °C ± 2 durante 7 dias. Colónias visualmente distintas e representativas da diversidade macróscopica observada foram selecionadas, isoladas e purificadas por riscado por exaustão em placas de TSA suplementado com NaCl (25 g L<sup>-1</sup>). Os isolados foram repicados quinzenalmente em meio sólido (TSA) e as culturas de trabalho foram mantidas a 4 °C e preservadas a longo prazo em glicerol 20 % (v/v) a -80 °C.

### **2.4.2. Tipagem dos isolados por BOX-PCR**

O método de tipagem BOX-PCR foi utilizado para detectar isolados pertencentes à mesma estirpe. Foi realizado um PCR do DNA genómico extraído a partir de uma única colónia bacteriana, suspensa em 50 µL de água ultra-pura, submetida a 2 ciclos de aquecimento a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 15 minutos a -80 °C. Os detritos celulares foram precipitados por centrifugação a 4000 g durante 2 min e alíquotas de 40 µL do sobrenadante foram transferidas para microtubos e armazenadas a -20 °C até serem utilizados como DNA molde na reação de PCR. O PCR foi realizado no termociclador (Tprofessional TRIO thermocycler). As reações foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 1 µL de DNA, 12,5 µL DreamTaq™ PCR Master Mix (Fisher Scientific), 1,5 µL do primer (10 µM) BOX\_A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G -3')<sup>38</sup>, 1,25 µL de 1% (v/v) dimetil sulfoxido (DMSO) e 8,75 µL de água.

Os controlos positivos e negativos foram executados para cada conjunto de PCR. As condições de amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial realizada a 94 °C durante 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min, ligação do

*primer* a 53 °C durante 2 min, e extensão da cadeia a 65 °C durante 8 min e por fim de uma extensão final a 65 °C durante 16 min. Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose 1,5% durante 120 minutos a 80 volt. Após obter o perfil de bandas dos isolados usando o Bio-Rad's ChemiDoc XRS+ system resultantes do BOX-PCR utilizou-se o software BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Bélgica), para os vários géis serem comparados entre si com uma referência fixa a fim de excluir clones ou isolados mais semelhantes. Os resultados obtidos através deste software foram depois analisados no Rsoftware versão<sup>39</sup>, usando o *vegan* package<sup>40</sup>, e as matrizes de distância de Bray-Curtis.

#### **2.4.3. Extração de DNA genómico dos isolados bacterianos endofíticos**

Isolados representativos de cada agrupamento de BOX-PCR foram selecionados para identificação por sequenciação do gene de 16S rRNA. Após o seu crescimento em placa, retirou-se uma colónia pura de cada isolado, inoculou-se em 5 mL de Tryptic Soy Broth (TSB; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi) e incubou-se *overnight* a 30 °C com agitação (110 rpm). Após 18 a 24 horas, as culturas foram retiradas do agitador e transferiu-se 1500 µL para microtubos. As células foram precipitadas por centrifugação a 13000 g durante 1 minuto. O DNA foi extraído a partir do *pellet* com o kit Higher Purity Bacterial Genomic DNA isolation Kit (Canvax) seguindo as instruções do fabricante. Não tendo sido previamente caracterizado o tipo Gram dos isolados, usou-se o método adequado a bactérias de Gram positivo, como foi aconselhado pelo fabricante, por assegurar maior eficácia.

#### **2.4.4. Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciação**

O DNA dos isolados foi usado para amplificação do gene 16S rRNA por PCR. As reações foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 1 µL de DNA, 12,5 µL DreamTaq™ PCR Master Mix (Fisher Scientific), 0,1 µM de cada *primer* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>41</sup>, 80 g mL<sup>-1</sup> albumina sérica bovina (BSA) e 10,5 µL de água.

Os controlos positivos e negativos foram executados para cada conjunto de PCR. As condições de amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante

5 min, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 seg, ligação dos *primer* a 56 °C durante 45 seg e extensão da cadeia a 72 °C durante 1,30 min, e extensão final a 72 °C durante 10 min. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1% com GelRed (Biotium), durante 20 minutos a 110 voltes. Os produtos de amplificação foram enviados para a empresa Eurofins (Alemanha) onde foram sequenciados usando o *primer* 27F.

#### **2.4.5. Identificação dos isolados endofíticos**

As sequências dos fragmentos do gene 16S rRNA obtidas para os isolados foram submetidas a comparações com as sequencias disponíveis nas bases de dados do National Centre of Biotechnology Information (NCBI)<sup>42</sup> e Ribosomal Database Project (RDP)<sup>43</sup>. Com o intuito de realizar análises de diversidade, as sequências foram submetidas a alinhamento e agrupamento em unidades taxonómicas operacionais (OTUs) considerando um limite de distância de 0,03 (97% de similaridade) no RDP<sup>43</sup>.

A tabela de OTU foi construída com as abundâncias das OTUs para todos os locais amostrados. Os índices de diversidade H' de Shannon e uniformidade de Pielou, baseados na abundância de OTUs foram obtidos usando o pacote Vegan<sup>40</sup> com funções diversidade e diversidade/log (número da especificação), respetivamente. Outros índices de diversidade alfa foram obtidos usando a função de estimativa de riqueza no pacote Phyloseq<sup>44</sup>. Para comparar a variação da composição de OTU entre locais, foi construída uma matriz de dissimilaridade com base na distância de Bray-Curtis usando a tabela de abundância de OTU de dados não transformados. A análise de ordenação multidimensional não métrica (NMDS) baseada na distância de Bray-Curtis foi realizada para avaliar graficamente a dissimilaridade entre locais de amostragem, empregando a função meta MDS, também no pacote Vegan. A correlação das características do sedimento com as comunidades microbianas e os locais foi analisada com envfit do pacote Vegan<sup>40</sup>. Uma sequência representante de cada OTU foi classificada taxonomicamente utilizando o melhor *hit* da pesquisa no NCBI utilizando a base de dados de RNA de organismos de referência (refseq\_rna)<sup>42</sup> e no servidor EzBioCloud server<sup>45</sup>. A sequencia nucleotídica de



cada representante de OTU foi submetida na base de dados do Genbank e encontra-se disponível com os números de acesso MT981726-MT981766.

## 2.5. Caracterização da comunidade total

### 2.5.1 Extração de DNA total e amplificação por PCR

Para as análises independentes de cultivo, foram contruídas 3 amostras compostas para cada um dos locais, cada amostra representa uma zona dentro do local (foram selecionadas 3 zonas dentro do local), cada amostra foi elaborada com três espécimes da mesma zona. O DNA total de raízes esterilizadas (secção 2.3.1) foi extraído com o *kit* comercial (ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit) segundo indicações do fabricante, e armazenado a -20 °C.

### 2.5.2. Análise por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Para a obtenção dos fragmentos do gene 16S rRNA adequados à análise por DGGE usou-se uma abordagem nested-PCR<sup>47</sup>. No primeiro PCR, usou-se os *primers* 27F e 1492R<sup>41</sup> e os volumes de reação descritos na alínea 2.3.4. Após confirmado o sucesso da amplificação por eletroforese, foi realizado o segundo PCR utilizando o produto da primeira amplificação como DNA molde e os *primers* 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGCCCCGGAACG-3'), com GC-Clamp (CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG) na extremidade 5' do primer 968F, para evitar a desnaturação completa de DNA de cadeia dupla durante a migração no gel<sup>46</sup>. A reação de PCR (volume total 25 µL) consistiu em 12,5 µL DreamTaq™ PCR Master Mix (Fisher Scientific), 0,1 µM de cada *primer*, 1% (v/v) dimetil sulfoxido (DMSO) e 1 µL do DNA molde.

As condições de amplificação para o segundo PCR foram as seguintes: desnaturação inicial realizada a 95 °C durante 4 min, 25 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 min, ligação do *primer* a 53 °C durante 1 min e extensão da cadeia a 72 °C durante 2 min, e extensão final a 72 °C por 10 min. Após a confirmação da amplificação dos fragmentos por

eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium), os produtos de PCR foram carregados num gel de poliacrilamida 6-10% (w/v). O gel foi montado no sistema de DGGE DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), em 1x Trisacetato-EDTA (TAE) com um gradiente de desnaturação variando de 40% a 58% e a eletroforese foi realizada a 60 °C e 80 V durante 16 horas. No final, o gel foi corado com nitrato de prata<sup>46</sup>. A imagem do gel DGGE foi adquirida usando um *scanner* fotográfico Epson perfection V700. A análise do perfil de DGGE foi feita com o software BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Bélgica). A posição das bandas e a intensidade foram processadas e transformadas numa tabela de abundância relativa e analisadas no R software<sup>39</sup> com o pacote Vegan<sup>40</sup>. A matriz de dados de abundância relativa foi transformada logaritmicamente e o coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis foi calculado com as funções *decostand* e *vegdist*, respetivamente. Foi feita a análise de componentes principais (PCO) dos perfis correspondentes às comunidades bacterianas em cada condição experimental usando a função *cmdscale()* e clusterização com a função *hclust* no R. Uma análise permutacional de variância bidirecional (PERMANOVA) foi usada para analisar as diferenças na composição da comunidade endofítica.

### 2.5.3. Sequenciação de nova geração

O DNA total da comunidade endofítica das amostras do Boco e Horta foram sujeitas a análise por sequenciação de nova geração. A região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA das comunidades microbianas endofíticas foi amplificada e sequenciada usando a plataforma Illumina MiSeq® 2X300 bp em Genoinseq (Cantanhede, Portugal) com os *primers* Bakt\_341F 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3 'e Bakt\_805R 5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3 '<sup>147,48</sup>.

### 2.5.4. Análises de dados do sequenciamento de nova geração

As leituras brutas foram extraídas do sistema Illumina MiSeq® em formato fastq e filtradas por qualidade com PRINSEQ versão 0.20.4<sup>49</sup> para remover adaptadores de

sequenciamento, leituras com menos de 150 bases e qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases.

As leituras diretas e reversas foram misturadas por sobreposição de leituras emparelhadas com AdapterRemoval versão 2.3.0<sup>50</sup> usando parâmetros padrão. Análises bioinformáticas adicionais foram processadas e analisadas usando o QIIME 2 versão 2020.8.0<sup>51</sup> e seus plug-ins. O plugin “Qiime tools import” foi usado para a importação de leituras de boa qualidade, de multiplexadas e emparelhadas e a criação do arquivo “artefato” (tipo “SequencesWithQuality”). O plugin DADA2<sup>52</sup> foi usado para a remoção de quimeras (método de consenso) e agrupamento em sequências representativas denominadas variantes de sequência de amplicon (ASVs).

A árvore filogenética foi construída com a sequência do gene 16S rRNA representativa inserida na filogenia de referência da versão 13\_8 de greengenes<sup>53</sup> usando “q2 plug-in -fragment-insertion”<sup>54</sup>. A classificação taxonômica das ASVs foi feita com o plug-in “q2-feature-classifier”<sup>49</sup> com o método classify-sklearn contra o Naïve pré-treinado Classificador Bayes baseado em sequências completas de SILVA 138 OTUs<sup>55</sup>. As análises que se seguiram foram realizadas no R software com o pacote Phyloseq<sup>56</sup>. A cobertura da sequenciação foi avaliada por análise de rarefação. Os índices de diversidade alfa chao1, espécies observadas, Shannon-Wiener Index H' e Simpson foram calculados como estimativa da diversidade e riqueza das comunidades bacterianas endofíticas. A relação entre a composição geral das comunidades nos dois locais (diversidade beta) foi analisada utilizando a matriz de distância de dissimilaridade de Bray Curtis e visualizada com uma análise de ordenação multidimensional não métrica (NMDS).

As diferenças estatísticas nos índices de diversidade alfa e a diversidade beta entre os locais foram determinadas pelo teste ANOVA. Para detetar espécies (ASVs) com abundâncias distintas nos dois locais, foi utilizado o pacote DESeq2 no R software<sup>57</sup>. Os parâmetros físico-químicos do solo foram ajustados ao espaço de ordenação usando a função envfit no pacote Vegan R<sup>40</sup>. A composição das comunidades foi expressa como abundâncias relativas ao nível de classe, família e género. Os gráficos foram feitos usando o pacote ggplot2<sup>58</sup>.

### 3. Resultados/Discussão

#### 3.1. Caracterização do ambiente sedimentar

Os parâmetros físico-químicos determinados para as águas intersticiais e sedimentos nos três locais amostrados na Ria de Aveiro são apresentados na Tabela 3. Os valores de pH dos sedimentos determinados em extratos em água e em solução de cálcio variaram entre 6,7 – 7,5. O sedimento de Santiago obteve os maiores valores de pH (7,4 – 7,5) sendo considerado como ligeiramente alcalino (7,4 – 7,8)<sup>59</sup>. Com base no pH, os sedimentos dos locais da Horta (7,2 – 7,3) e Boco (6,7) foram classificados como neutros. A condutividade elétrica (EC) dos sedimentos foi superior em Santiago com um valor de 47 dS m<sup>-1</sup>, seguido da Horta com 34,4 dS m<sup>-1</sup> e por último, Boco com 15,01 dS m<sup>-1</sup>. Estes valores de EC dos sedimentos estão relacionados com a condutividade elétrica dos extratos de saturação do solo (ECe). Os valores de ECe variaram entre 56-177 dS m<sup>-1</sup> correspondendo a solos salinos (ECe > 16 dS m<sup>-1</sup>)<sup>36</sup>. Tendo em consideração o ECe e os valores estimados para SAR e ESP, os solos dos locais de Horta e Boco foram classificados como solos salino-sódicos e Santiago como salino não sódico<sup>36</sup>. Estes resultados estão em concordância com o esperado visto que Santiago fica no local de marinha de sal ainda em atividade. Em Santiago registaram-se valores de matéria orgânica (4,3%) inferiores aos registados na Horta (6,1%) e Boco (7,2%).

As amostras de sedimentos analisadas por ICP-MS para determinar as concentrações totais de elementos mais relevantes estão exibidas na Tabela 3. Como seria de esperar, todos os sedimentos apresentaram valores elevados de Na elevados, sendo este elemento usado por *S. ramosissima* como substância de ajuste osmótico<sup>19</sup>. No local Horta registaram-se valores de Ca elevados, comparando com os outros locais, e no local Boco obteve-se valores muito superiores de Mn.

**Tabela 3** – Parâmetros físico-químicos sedimentos e água intersticial provenientes dos 3 locais da Ria de Aveiro.

	SEDIMENTOS							AGUA INTERSTICIAL	
	pHw <sup>a</sup>	pHca <sup>b</sup>	EC <sup>c</sup> (dSm <sup>-1</sup> )	OM <sup>d</sup> (w/w%)	SAR <sup>e</sup>	ESP <sup>f</sup>	ECe <sup>g</sup> (dSm <sup>-1</sup> )	pH	EC (dSm <sup>-1</sup> )
Santiago	7,5	7,4	47,2	4,3	10,5	13	177	7	128,5
Horta	7,3	7,2	34,3	6,1	12	15	129	7,3	113,1
Boco	6,7	6,7	15,01	7,2	12,3	17	56	7,6	68,5

a -Potencial hidrogeniônico determinado em água

b - Potencial hidrogeniônico determinado em solução de cloreto de cálcio

c - Condutividade elétrica

d - Matéria orgânica

e - Taxa de adsorção de sódio

f - Percentagem de sódio trocável

g - Condutividade elétrica do extrato de saturação

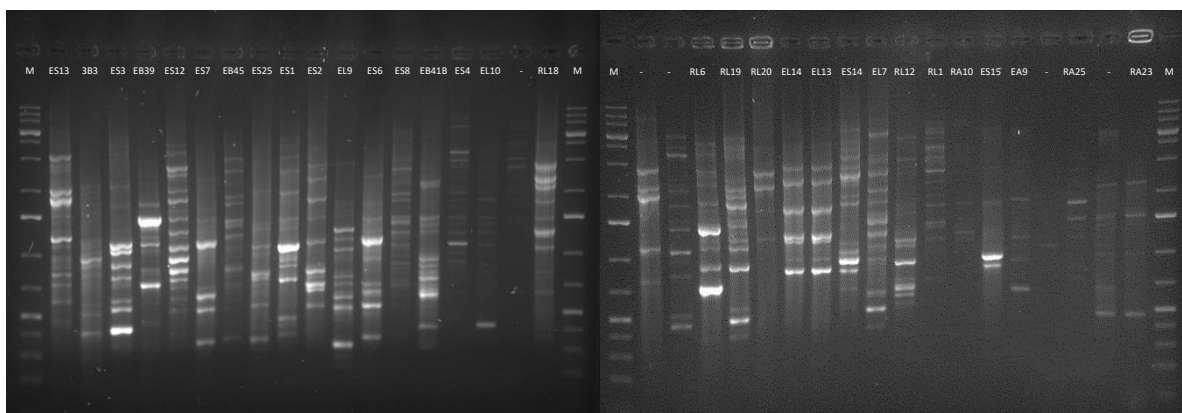
**Tabela 4** – Análise elementar dos sedimentos de 3 locais da Ria de Aveiro.

	Sódio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Magnésio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Alumínio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Fósforo [mg kg <sup>-1</sup> ]	Potássio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Cálcio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Manganês [mg kg <sup>-1</sup> ]	Ferro [mg kg <sup>-1</sup> ]	Cobalto [mg kg <sup>-1</sup> ]	Níquel [mg kg <sup>-1</sup> ]	Cobre [mg kg <sup>-1</sup> ]	Zinco [mg kg <sup>-1</sup> ]	Arsênio [mg kg <sup>-1</sup> ]	Estrôncio [mg kg <sup>-1</sup> ]
<b>Santiago</b>	19807,3	8852	8502,2	333,3	3412,9	1974,1	44,9	7708,2	1,9	5	23,8	37,9	4,6	21,2
<b>Horta</b>	20277,5	7443,9	11298,2	291,7	4490,4	4705,9	79,3	13305,7	3,8	10,8	15,3	88,6	7	40,4
<b>Boco</b>	12708,4	5909,8	17092,8	154,4	5929,3	1917,3	390,9	14649,5	7,1	12,3	8,1	25,2	8,7	31

Na água intersticial registaram-se valores de pH diferentes dos do sedimento. Nas amostras de Santiago obteve-se um valor neutro (7,0), inferior ao pH do sedimento, na Horta o pH da água foi idêntico ao do sedimento (7,3) e no Boco, o pH da água intersticial foi ligeiramente alcalino (7,6). A condutividade elétrica da água intersticial foi coerente com a EC dos sedimentos. O local com os valores mais elevados foi Santiago com  $128,5 \text{ dSm}^{-1}$  seguido da Horta com  $113,1 \text{ dSm}^{-1}$  e Boco com  $68,5 \text{ dSm}^{-1}$ .

### 3.2. Identificação de isolados de bactérias endofíticas

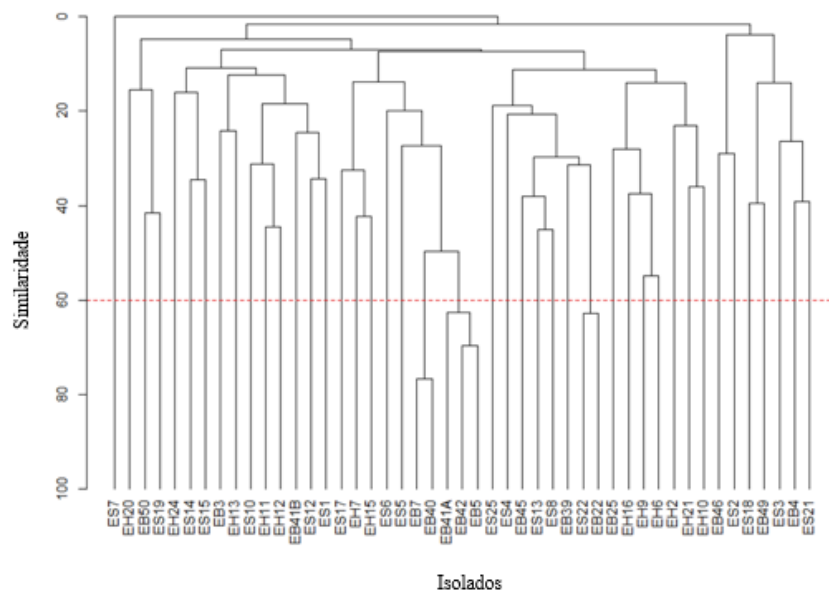
No total, foram obtidos 53 isolados bacterianos a partir da endosfera da raiz de *S. ramosissima* de três locais diferentes da Ria de Aveiro. Não foram observadas colónias nas placas utilizadas como controlo de assepsia, evidenciando assim a eficácia do processo de desinfestação. O BOX-PCR foi feito a partir do DNA de uma única colónia para cada um dos isolados endófitos. A Figura 5 ilustra dois géis de agarose obtidos após o BOX-PCR.



**Figura 5** – Eletroforeses em géis de agarose (1.5%) dos perfis genómicos obtidos por BOX-PCR a partir do DNA genómico dos diferentes isolados bacterianos. M: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific™).

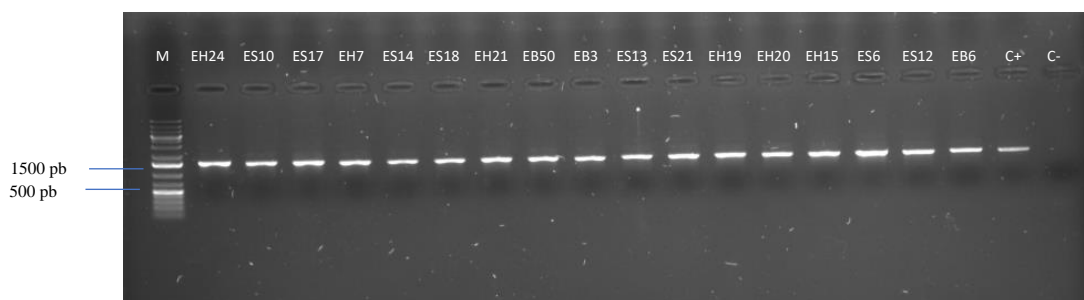
A Figura 6 representa o agrupamento obtido a partir da análise de similaridade de Bray-Curtis, que permitiu relacionar os diferentes perfis genómicos obtidos para os isolados através dos géis de agarose (Figura 5). A partir destes resultados e da inspeção visual dos perfis concluiu-se que os isolados apresentavam pouca similaridade entre si, provavelmente por terem origem em locais diferentes. Foram agrupados apenas 4 isolados

(EB40, EB41A, EB42 e ES22) que apresentaram similaridade acima de 60% entre si (Figura 6).



**Figura 6** – Dendrograma de similaridade com base em características genóticas (BOX-PCR) dos isolados em três locais distintos da ria de Aveiro.

No total, foram selecionados 49 isolados para sequenciação. A Figura 7 ilustra um gel de agarose obtido após o PCR para amplificação do gene 16S rRNA , onde é possível observar uma banda do tamanho esperado (aprox. 1500 pb) bem definida, assegurando que o DNA apresentava qualidade para sequenciação.



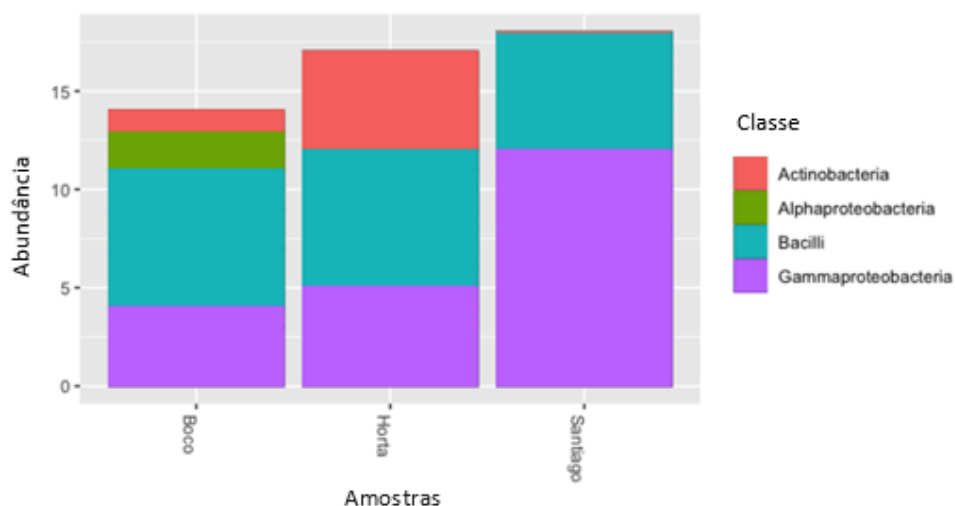
**Figura 7** – Gel de agarose (1%) resultante do PCR do gene 16S rRNA em alguns isolados. M: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific™), C+: Controlo positivo, C-: Controlo negativo.

Na tabela 5 é apresentado um resumo do resultado da sequenciação de 14 isolados do Boco, 17 da Horta e 18 de Santiago.

**Tabela 5** – Análise das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas para os isolados bacterianos

	<b>Boco</b>	<b>Horta</b>	<b>Santiago</b>
<b>Número de isolados</b>	14	17	18
<b>Comprimento médio da sequência 16SrRNA</b>	926	915	920

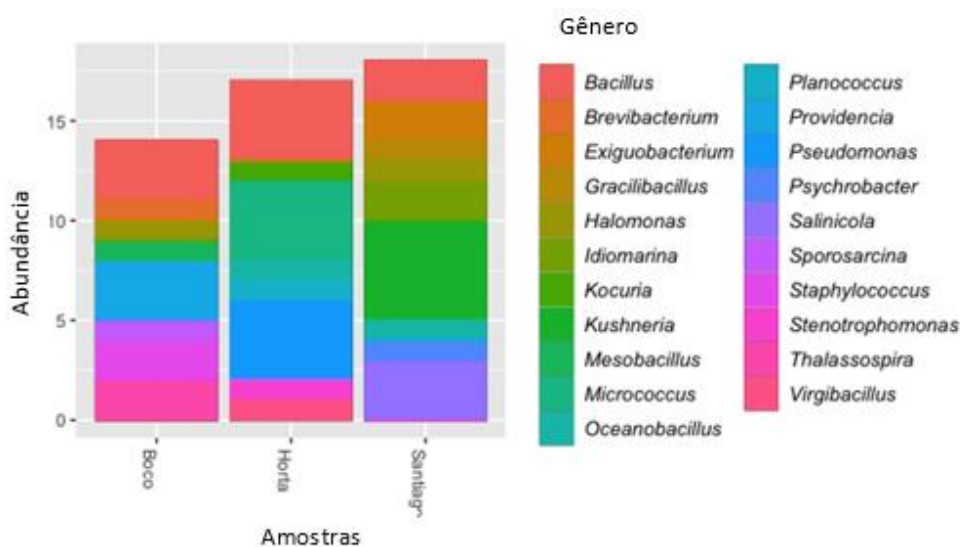
Os isolados foram identificados como pertencentes a 4 classes bacterianas: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli e Gammaproteobacteria (Figura 8). O Boco apresentou o maior número de classes taxonómicas, sendo a classe Bacilli a mais abundante (50% dos isolados), seguida da classe Gammaproteobacteria (35%) e em menor proporção, dois isolados representantes da classe Alphaproteobacteria e um isolado pertencente a Actinobacteria. Na Horta, foram identificadas bactérias endofíticas pertencentes as classes taxonómicas Actinobacteria, Bacilli e Gammaproteobacteria em proporções similares, e nenhum isolado de Alphaproteobacteria. Em Santiago, os isolados foram identificados como Gammaproteobacteria e Bacilli.



**Figura 8** – Afiliação taxonómica ao nível da classe de bactérias endofíticas da raiz de *Salicornia ramosíssima* de três locais da ria de Aveiro.



Foram obtidos 21 géneros diferentes (Figura 9). O local Boco teve maior representação do géneros *Bacillus* (29%) e *Providencia* (21%). No local Horta, os géneros dominantes foram *Bacillus* (35%), *Micrococcus* (24%) e *Pseudomonas* (18%), e em Santiago, observou-se maior abundância relativa dos género *Kushneria* (28%) e *Salinicola* (17%). O género mais dominante nos três locais foi *Bacillus*, que foi também o único género de ocorrência comum aos 3 locais. O género *Kushneria* foi encontrado exclusivamente no local mais salino, Santiago. Este género foi proposto pela primeira vez em 2009 para agrupar uma nova espécie isolada das folhas da halófito *Avicennia germinans* e outras espécies anteriormente incluídas no género *Halomonas*<sup>60</sup>. Diversos estudos têm mostrado variações significativas na expressão de proteínas envolvidas na osmorregulação, resposta ao estresse, geração de energia e transporte sobre estresse salino em representantes deste género<sup>61</sup> assim como propriedades de promoção de crescimento de plantas na presença de salinidade elevada e metais pesados<sup>62</sup>. Outros géneros como *Sporosarcina* e *Thalassospira* foram isolados das raízes da halófito *Aster tripolium*<sup>63</sup>. Algumas espécies de *Bacillus* e *Gracilibacillus* são membros comuns das comunidade endofíticas, com atividades de promoção do crescimento da halófito *Arthrocnemum macrostachyum*<sup>64</sup>.



**Figura 9** - Classificação das bactérias endofíticas de raízes de *S. ramosissima* de três locais da ria de Aveiro ao nível do género.

### 3.3. Análise da diversidade de bactérias endofíticas isoladas

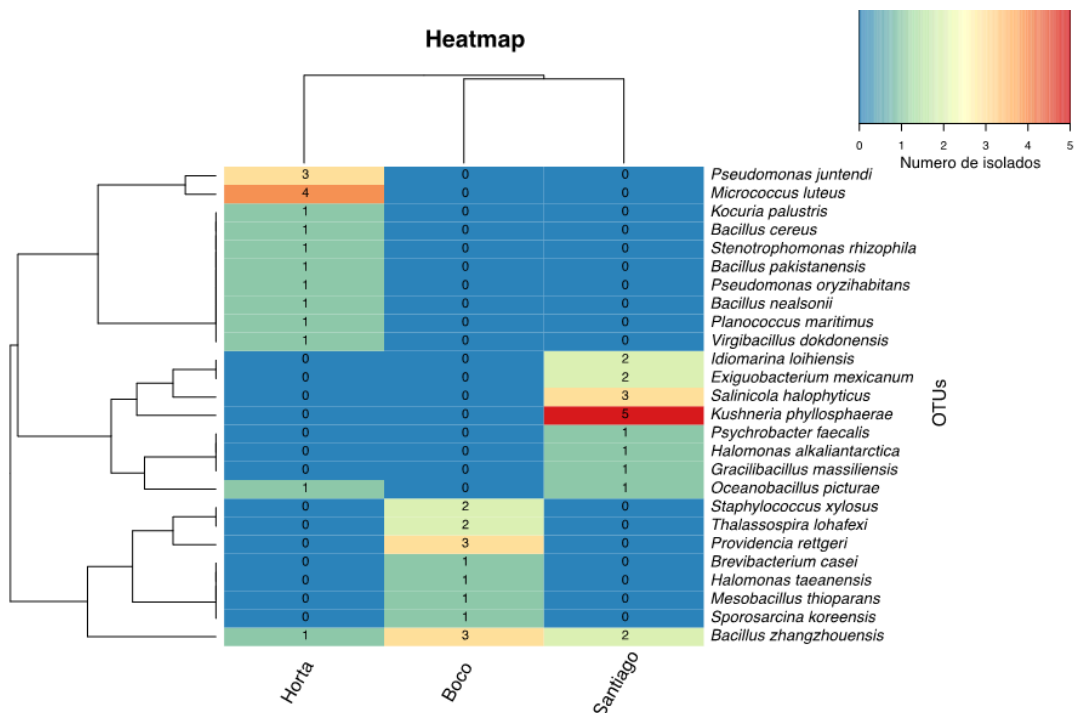
As 49 seqüências de rRNA 16S obtidas dos isolados bacterianos foram submetidas a alinhamento e clusterização, resultando em 26 OTUs com 97% de similaridade. A Tabela 6 representa os índices de diversidade alfa que avaliam a diversidade intrínseca em cada comunidade ou local. Os índices mais utilizados para expressar a diversidade alfa são o índice de Shannon e índice de Simpson<sup>65</sup>. Os valores destes índices não foram muito diferentes entre locais: o índice de Simpson variou de 0,85 a 0,88 e o índice de Shannon variou de 1,97 a 2,31. No entanto, o índice de diversidade Shannon calculado para a comunidade do local Horta, foi ligeiramente superior, apontando para uma maior diversidade da fração cultivável da comunidade endofítica.

**Tabela 6** – Comparação da riqueza e índices de diversidade alfa estimados.

	<b>Número de isolados</b>	<b>OTUs</b>	<b>Shannon</b>	<b>Simpson</b>	<b>InvSimpson</b>
<b>Boco</b>	14	8	1,97	0,85	6,53
<b>Horta</b>	17	12	2,31	0,88	8,26
<b>Santiago</b>	18	9	2,03	0,85	6,48

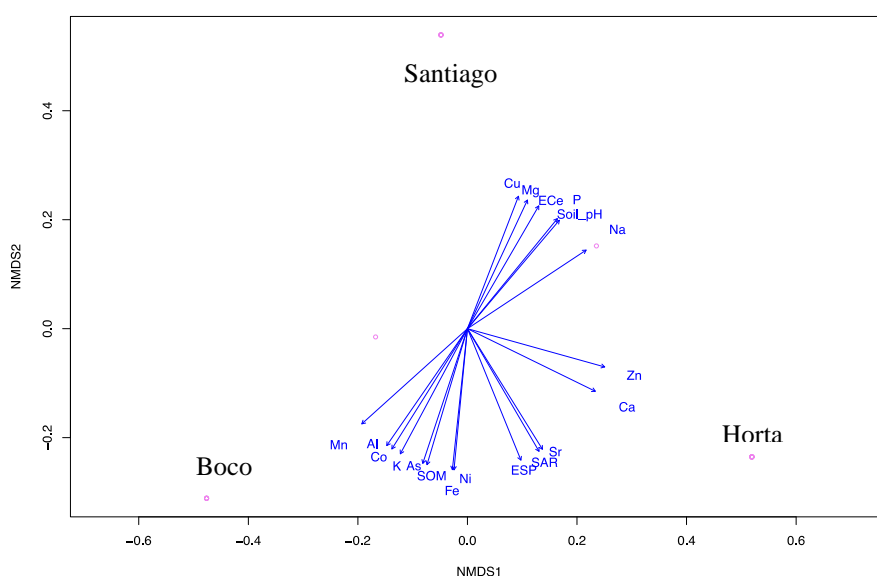
A identificação e abundância de cada OTU, nos diferentes locais de colheita, está representada na Figura 10. A identificação taxonômica das OTUs foi realizada utilizando o banco de seqüências 16S rRNA de referência do NCBI que mostraram similaridades entre 98.1%-100% com seqüências conhecidas. Esta informação consta do Anexo 1. O *heatmap* (Fig. 10) mostra uma clara diferença entre locais, expressa por perfis característicos de presença e abundância relativa. Todas as OTUs tiveram ocorrência restrita a apenas um local, com a exceção de *Bacillus zhangzhouensis* que foi isolado em todos os locais, e de *Oceanobacillus picturae* que foi isolado nos dois locais mais salinos, Horta e Santiago. Esta diferença na composição da fração cultivável das comunidades endofíticas da raiz de *S. ramosissima* em três locais diferentes da Ria de Aveiro já tinha sido observada na

distribuição dos gêneros, já que o único gênero comum aos três locais foi gênero *Bacillus* (Fig. 10). Uma estirpe de *Bacillus zhangzhouensis* com capacidade de produzir IAA, crescer em meio sem nitrogênio e produzir compostos voláteis inibidores de fungos foi isolada em solo de floresta, como parte da comunidades bacteriana associada a micorrizas, o que confirma o potencial efeito desta bactéria na promoção do crescimento de plantas<sup>66</sup>. *Oceanobacillus* tem sido isolado a partir de diversas amostras ambientais, incluindo sedimentos oceânicos e habitats hipersalinos e foi a primeira bactéria halofílica a ser isolado do intestino humano<sup>67</sup>. Uma estirpe halotolerante de *O. picturae* com capacidade de solubilizar fosfato foi isolada da rizosfera da halófito de mangal *Avicennia marina*<sup>68</sup>. *Kushneria phyllosphaerae* foi abundante na coleção de isolados de Santiago. Esta espécie foi isolada pela primeira vez, da endosfera da halófito *Arthrocnemum macrostachyum*, exibindo várias características promotoras do crescimento de plantas<sup>69</sup>. No local Boco *Providencia rettgeri* e *Bacillus zhangzhouensis* foram as mais abundantes. *Providencia rettgeri* foi já reportada como produtora de IAA<sup>70</sup>. *Micrococcus luteus* foi dominante na coleção de isolados do local Horta. A sequenciação do genoma de *M. luteus* isolado de raízes de *Cyperus conglomeratus* da costa do Mar Vermelho permitiu detetar determinantes genéticos para diversas atividades promotoras do crescimento de plantas<sup>71</sup>.



**Figura 10** - Heatmap das abundâncias relativas de OTUs presentes em cada local e dendrograma mostrando o agrupamento hierárquico entre os locais.

A relação entre a estrutura da fração cultivável da comunidade bacteriana endofítica e os parâmetros físico-químicos dos sedimentos foi investigada por ordenação multidimensional não métrica (NMDS). A representação gráfica da análise NDMS (Figura 11) separa claramente as coleções de isolados dos diferentes locais. Os elementos Cu, Mg e P, a condutividade elétrica (ECe), o pH do sedimento e o conteúdo em Na estão associados com a composição da comunidade de endofíticas de Santiago. Outros elementos como Zn e Ca, mostram maior relação a composição da comunidade do local da Horta. No Boco, a maior associação é com o conteúdo do sedimento em Al, Co, K, As, Fe, Ni e matéria orgânica (SOM).



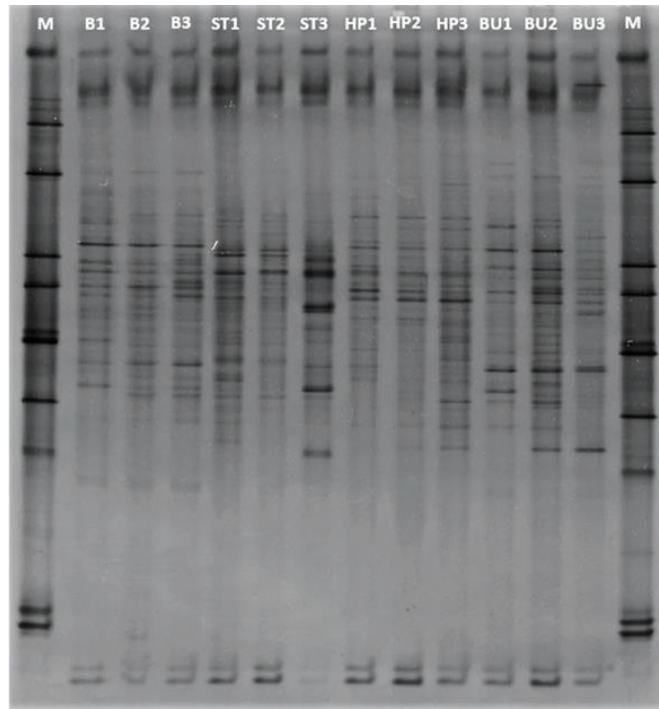
**Figura 11** – Representação da análise NMDS relacionado a abundância de OTUs referente a cada local com os parâmetros físico-químicos.

### 3.4. Análise das comunidades totais

#### 3.4.1 Comparação da estrutura das comunidades por DGGE

A análise de perfis de DGGE foi usada para uma comparação preliminar da estrutura das comunidades endofíticas em diferentes sub-amostras do mesmo local, com o objetivo de racionalizar o esforço de sequenciação subsequente. As sub-amostra foram compostas com raízes de 3 espécimens (plantas), colhidas em cada um dos locais Boco (B), Santiago

(ST) e Horta (HP). No local Boco, as sub-mostras BU1, BU2 E BU3 correspondem a material de uma única planta, de cada ponto de amostragem.

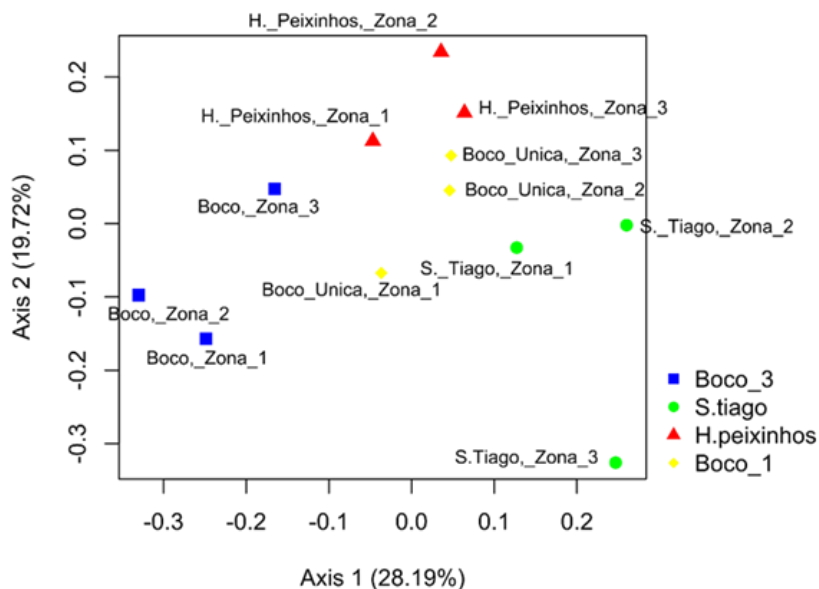


**Figura 12** – Perfis PCR-DGGE das comunidades de bactérias endofíticas da raiz de *S. ramosissima* em 3 locais da Ria de Aveiro. B1-B3 correspondem a 3 pontos do local Boco; ST1 – ST3 correspondem a 3 pontos do local Santiago; HP-HP3 correspondem a 3 pontos do local Horta; BU1-HP3 correspondem a amostras de um único espécimen de cada ponto de amostragem no local Boco.

No geral, os perfis de DGGE (Figura 12) mostram que as raízes de *S. ramosissima* apresentam comunidades bacterianas endofíticas diversas. A análise de PERMANOVA a partir da matriz de dissimilaridades de Bray-Curtis mostrou diferenças significativas entre locais ( $P = 0,001$ ), mas não entre sub-amostras de cada local.

A análise das diferenças através de uma análise de componentes principais (PCO) a partir dos perfis de DGGE, mostrou agrupamento entre sub-amostras do mesmo local indicando maior similaridade entre comunidades endofíticas em diferentes pontos do mesmo local do que entre locais diferentes (Figura 13). Estas observações sugerem um forte efeito das condições ambientais no microbioma associado às plantas. Um estudo feito por Szymanska et al (2018)<sup>15</sup> em bactérias endofíticas da raiz de *S. europeia* mostrou baixa

variabilidade entre 3 subamostras, cada uma com 3 réplicas, de dois locais de colheita distintos, confirmado o efeito de parâmetros relacionais com o local na definição da estrutura e composição das comunidades associadas a uma mesma espécie de planta hospedeira.



**Figura 13** – Análise de componentes principais (PCO) dos perfis DGGE das comunidades bacterianas endofíticas associadas aos tecidos radiculares de plantas de *S. ramosíssima* nos diferentes locais amostrados.

### 3.4.2 Sequenciação Illumina

Com o intuito de estudar mais detalhadamente as diferenças entre comunidades de endofíticas associadas a diferentes populações de *S. ramosíssima* foi feita sequenciação de nova geração (Illumina) dirigidas ao gene 16S rRNA, do DNA das comunidades endofíticas dos locais de Horta e Boco. Estes locais foram selecionados por representarem condições contrastantes quanto aos usos do solo e por apresentarem perfis de DGGE distintos. O local da Horta é caracterizado por um solo altamente salino utilizado para o cultivo intensivo de *S. ramosíssima* e o local de Boco é caracterizado pelo crescimento natural da *Salicornia* e condições menos salinas.

**Tabela 7** – Número de sequências, riqueza de espécies e estimativa de diversidade das comunidades endofíticas obtidos por sequenciamento de nova geração.

Amostra	Sequencias	ASVs	Chao1	Shannon	Simpson
BOCO 1	12004	179	179	4,7	0,99
BOCO 2	21163	338	338	5,2	0,99
BOCO 3	26859	368	368	5,3	0,99
HORTA 1	29920	479	479	5,5	0,99
HORTA 2	14522	246	246	4,9	0,99
HORTA 3	27320	407	407	5,3	0,99

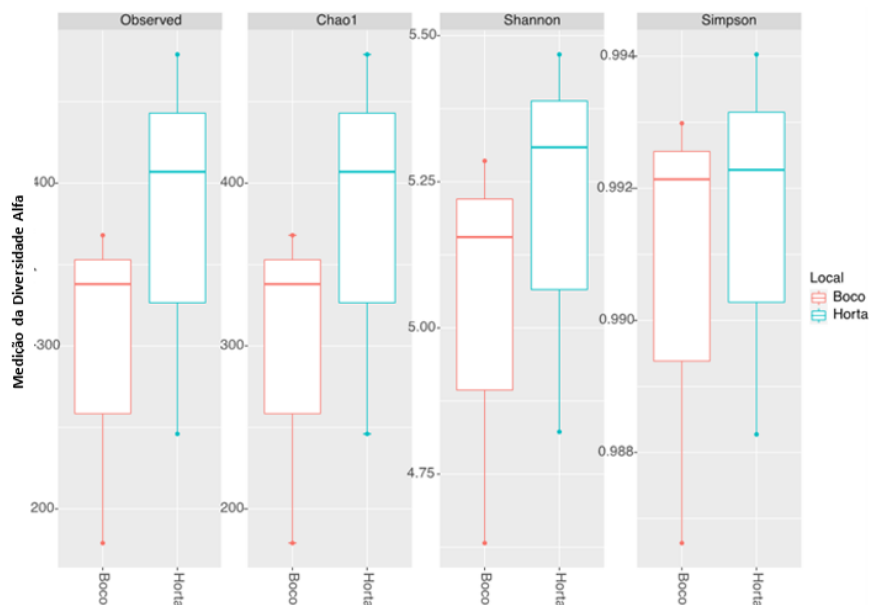
<sup>a</sup> ASVs: Variantes de sequência do amplicão

<sup>b</sup> Chao1: Estimação de riqueza de espécies

<sup>c</sup> Índice de biodiversidade de Shannon (>0, maior mais diverso)

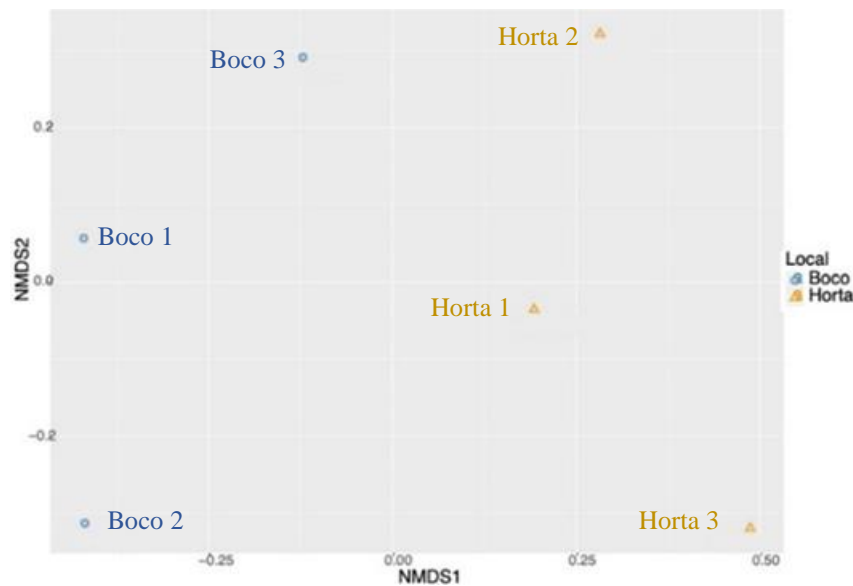
<sup>d</sup> Índice de diversidade Simpson (0-1; 0 = mais simples)

Após a obtenção das sequências, filtragem de qualidade das leituras e remoção de quimeras, foi obtido um total de 131.788 leituras, variando de 12.004 a 29.920 leituras por amostra (Tabela 7). As leituras de boa qualidade foram agrupadas em 99% identidade de sequência / ASVs totalizando 7.399 ASVs.



**Figura 14** – Representação com boxplots das médias entre as réplicas dos índices de diversidade determinados para as comunidades endofíticas dos locais Horta e Boco.

O número de ASVs obtidos para cada amostra e os correspondentes valores dos índices de riqueza e diversidade são apresentados na Tabela 7. Os valores dos índices de riqueza e diversidade foram, em média, superiores na comunidade de endofíticas do local Horta (Fig. 14). No entanto, a análise ANOVA ( $p < 0,05$ ) não mostra efeito significativo do local (Horta ou Boco) no número de ASVs ( $P = 0.414$ ) nem nos índices de riqueza e diversidade Chao1 ( $P = 0.414$ ), Shannon ( $P = 0.563$ ) ou Simpson ( $P = 0.737$ ).

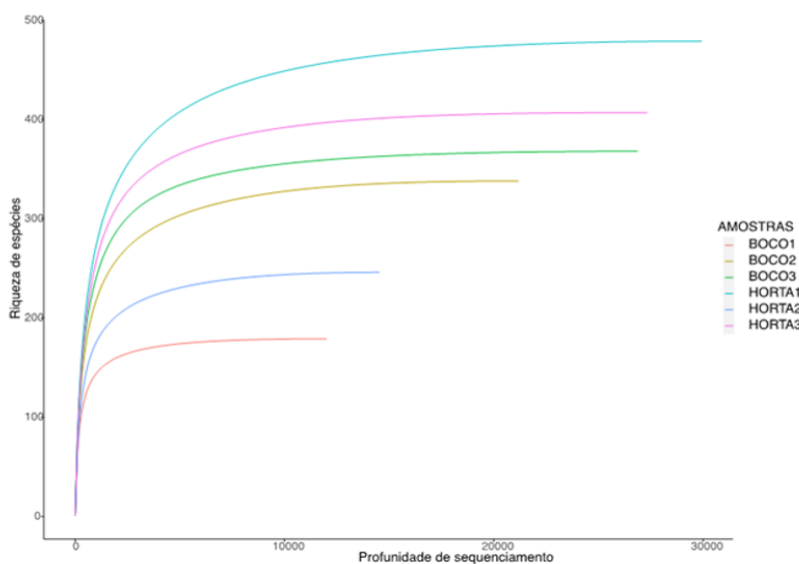


**Figura 15** – Análise de escala multidimensional não métrica baseada em Bray-Curtis par a par das comunidades bacterianas endofíticas. As cores e a forma representam o local de amostragem.

As análises de diversidade beta foram usadas na perspectiva de avaliar o grau de similaridade entre as comunidades de bactérias endofíticas de *S. ramosissima* dos dois locais, Boco e Horta. As diferenças foram avaliadas por análise de ordenação multidimensional não métrica (NMDS) usando a distância de Bray-Curtis (Figura 15). A representação gráfica mostrou a separação das amostras por local (Horta e Boco) (stress 0.05) segundo o primeiro eixo.



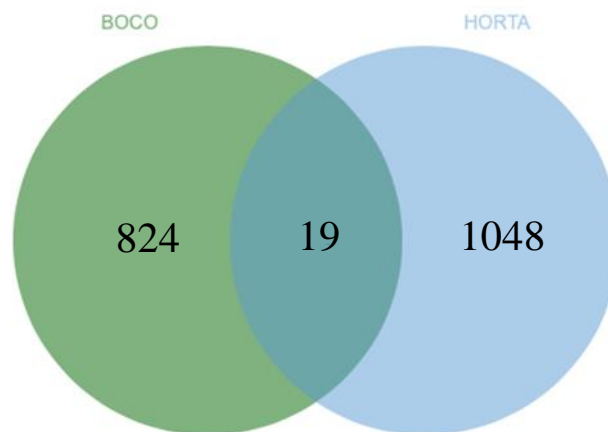
As curvas de rarefação construídas com a riqueza de espécies (número de ASVs) (Figura 16) mostraram que a saturação foi atingida em as amostras, indicando que o esforço de sequenciação foi suficiente para representar adequadamente a diversidade das comunidades endofíticas. Verificou-se que a partir das 12.004 sequências (número mínimo de ASVs, correspondente à amostra EBOCO1; Tabela 6), com o aumento da profundidade de sequenciação não se observou um aumento significativamente no número de ASVs mostrando assim que o número de espécies não é afetado pela profundidade do sequenciamento. Assim, procedeu-se à normalização dos dados, sub-amostrando todas as amostras para o mesmo número de sequências (12.004).



**Figura 16** – Curvas de rarefação da riqueza de espécies em função do esforço de sequenciação de comunidades bacterianas endofíticas de *Salicornia ramosissima* de dois locais da Ria de Aveiro, Horta e Boco.

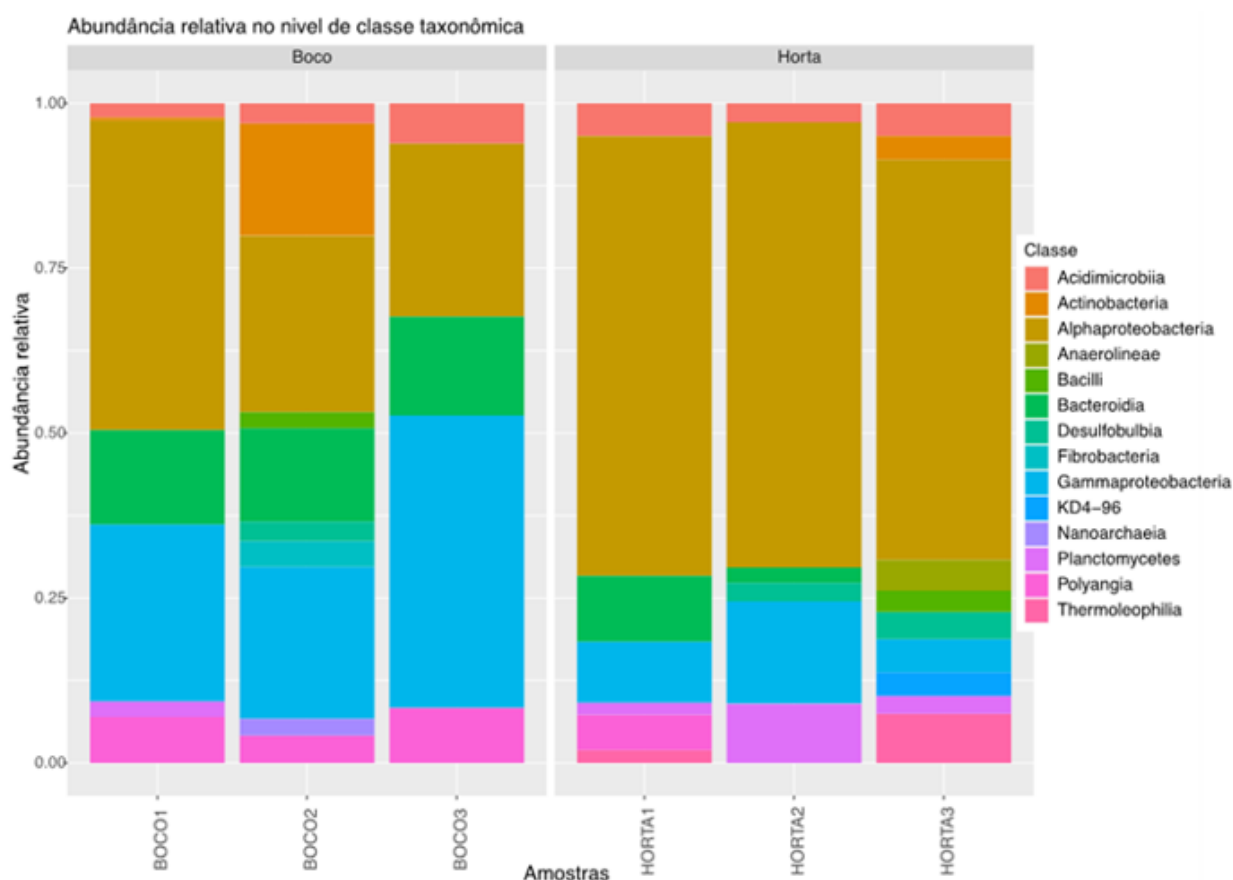
Após a normalização, obteve-se 1910 ASV cuja distribuição por locais está representada na Figura 17. Em concordância com os índices de diversidade (Tabela 7 e Figura 14), o número total de ASVs no local Horta foi maior (1067) do que no local Boco (843). O número ASVs comuns aos dois locais foi <1% do total, correspondendo a  $\gamma$ -Proteobacteria (10),  $\alpha$ -Proteobacteria (6), Myxococcota (2) e Bacteroidia (1) (Anexo 3). Estes resultados são diferentes dos obtidos por Szymanska et al (2018)<sup>15</sup> em dois locais com diferentes salinidades (ECe 113 e 63 dS m<sup>-1</sup>) em que o número de OTUs comuns aos dois

locais (1479), era superior ao número de OTUs exclusivas de cada local (1887 no local mais salino e 1129 no local menos salino), parte desta diferença pode-se dever ao facto que este trabalho utilizou OTUs com 97% de similaridade enquanto o nosso trabalho utilizou ASVs com 99% similaridade. Apesar disso estes resultados podem também sugerir que para além da salinidade, outros fatores, nomeadamente relacionados com as características físico-químicas dos sedimentos, o historial de utilização (e.g. salicultura, aquacultura), o genótipo das plantas e a diversidade da vegetação halófitas podem ser relevantes na constituição das comunidades endofíticas da raiz, em cada população de *S. ramosissima*.



**Figura 17** – Diagrama de Venn representando o número de ASVs correspondentes a bactérias endofíticas das raízes de *Salicornia ramosissima* nos locais Boco e Horta.

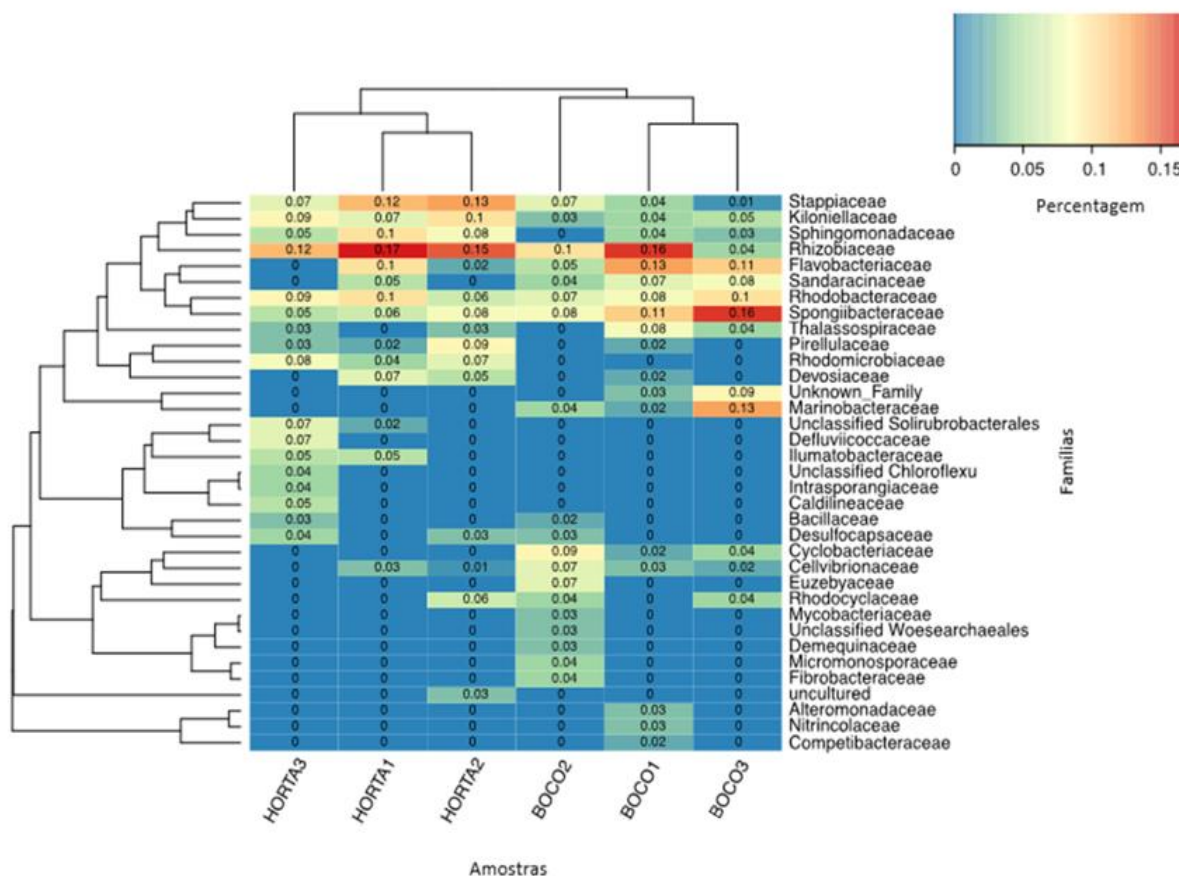
Para obter uma perspetiva mais geral sobre os traços dominantes da estrutura e composição das comunidades endofíticas as leituras de baixa abundância (< 1% abundância relativa) foram excluídas das análises e a composição da fração de maior abundância relativa, ao nível da classe, está representada na Figura 18. Foram identificadas 13 classes de Bacteria e 1 classe de Archaea, esta última detetada no local Boco com uma abundância relativa de 3%. As classes  $\alpha$ -Proteobacteria e  $\gamma$ -Proteobacteria foram as mais representadas em todos os locais e sub-amostras. As classes Bacteroidia e Acidimicrobia, foram minoritárias em ambos os locais.



**Figura 18** – Afiliação taxonômica e abundância relativa dos ASVs (abundância >1%) ao nível da classe, nos diferentes locais e sub-amostras.

Estudos anteriores em que foi usada a sequenciação Miseq Illumina para a caracterização de comunidades bacterianas associadas à raiz de espécies de *Salicornia*, identificou um total de 106 classes, 19 das quais (e.g.  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria, Acidimicrobiae Bacteroidia) representadas nas comunidades de bactérias endofíticas<sup>25</sup>. Outro estudo, baseado na mesma plataforma de sequenciação, dirigido a raízes e caules de *S. europaea* revelou a dominância de  $\gamma$ -Proteobacteria e Flavobacteriia, e a presença de Cytophagia e  $\alpha$ -Proteobacteria, estando estas últimas mais representadas nas raízes<sup>21</sup>. Tal como nos resultados do presente trabalho, Yang et al (2016)<sup>72</sup> reportaram a abundância de  $\alpha$ -Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria na rizosfera da halófito *Helianthus tuberosus*.

O agrupamento das amostras por similaridade com base na composição taxonômica e abundância relativa ao nível da família está representada na Figura 19. As famílias *Stappiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Flavobacteriaceae* e *Spongiibactereacea* estão bem representadas nos dois locais, com abundâncias relativas que podem atingir 17% (*Rhizobiaceae* na amostra Horta 1).

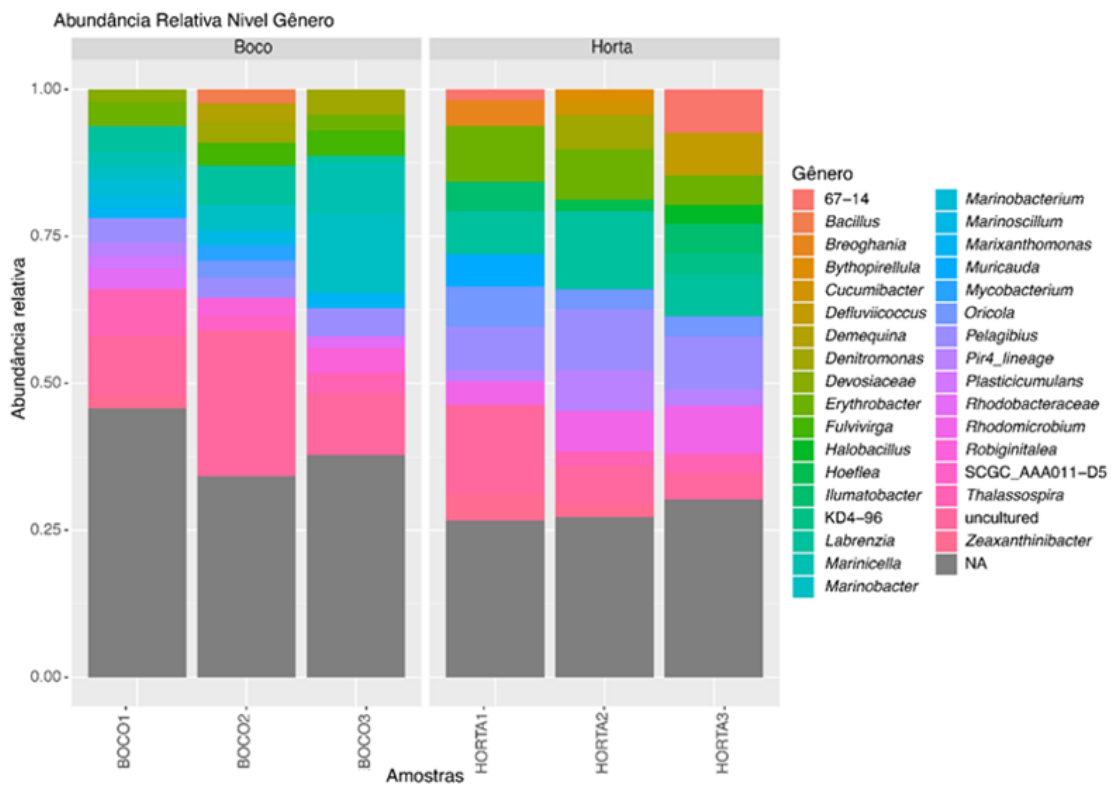


**Figura 19** – Heatmap da abundância relativa de famílias representadas com  $\geq 1\%$  de abundância relativa nas comunidades bacterianas endofíticas de *S. ramosissima* dos locais Horta e Boco, baseado na distância de Bray-Curtis.

A família *Stappiaceae*, anteriormente incluída nas *Rhodobacteraceae* e recentemente reclassificada e renomeada<sup>73</sup>, foi encontrada em média, com abundâncias de aproximadamente 10% na Horta e 4% no Boco. São bactérias de Gram negativo, maioritariamente aeróbias ou anaeróbias facultativos e heterotróficos<sup>73</sup>. A família *Rhizobiaceae*, com abundância relativa média de 15% no local Horta e 10% no Boco, contém atualmente espécies de bactérias de rápido crescimento, que podem ser

saprófitas ou mutualistas de plantas<sup>74</sup>. A família Flavobacteriaceae, mais representada no local Boco, é a maior família do filo Bacteroidetes. Os seus membros ocupam uma grande diversidade de habitats estando amplamente distribuídos no meio marinho<sup>75</sup>. A família *Spongiibactereaceae* ( $\gamma$ -Proteobacteria) ocorre sobretudo em ambientes marinhos<sup>76</sup>. A família *Rhodomicrobiaceae* ( $\alpha$ -Proteobacteria) foi detetada nas três amostras do local Horta, mas em nenhuma do local Boco. Inclui apenas uma espécie cultivável, *Rhodomicrobium vannieli*<sup>77</sup>. Pelo contrário, as famílias *Cyclobacteriaceae* e *Marinobacteraceae* foram detetadas nas três amostras do Boco mas não nas amostras do local Horta. A família *Cyclobacteriaceae* (Bacteroidetes) inclui 45 espécies distribuídas por 14 géneros, na maioria característicos de habitats marinhos como salinas, água do mar e sedimentos marinhos<sup>78</sup>. A família *Marinobacteraceae* ( $\gamma$ -Proteobacteria) foi proposta recentemente para agrupar os géneros *Marinobacter*, *Mangrovitalea*, *Pseudohalomonas*, e *Tamilnaduibacter*<sup>79</sup>. Membros desta família têm sido isolados de sedimentos de ambientes marinhos e uma espécie, *Marinobacter lipolyticus*, foi testada com sucesso na atenuação do stresse salino em trigo<sup>80</sup>.

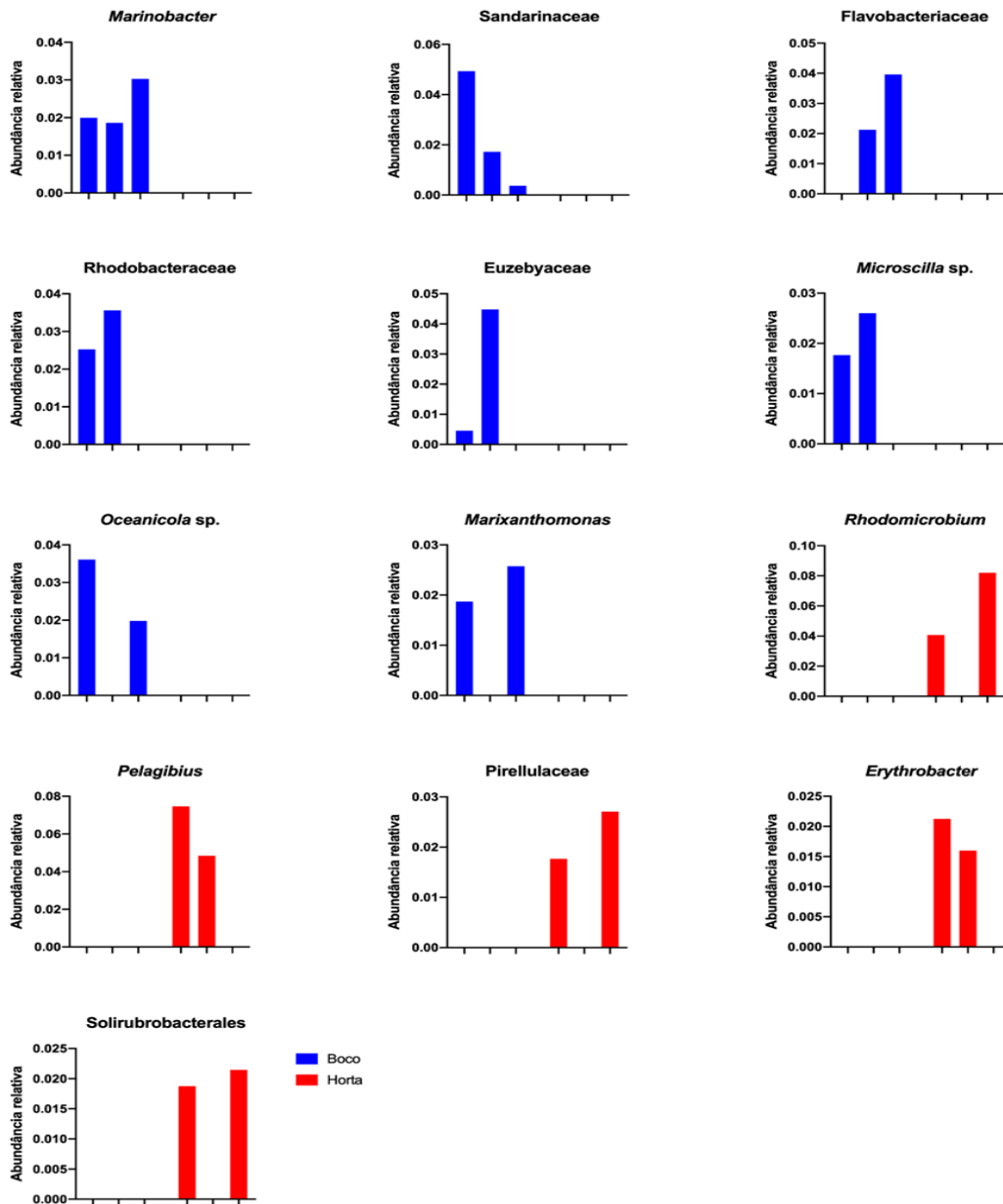
Foram identificados 33 géneros, mas ficaram por atribuir à categoria de género cerca de 30-40% das sequências. A Figura 20 representa a composição das comunidades de bactérias endófitas nas amostras de Horta e Boco, ao nível taxonómico de género (Anexo 2). Os géneros de  $\alpha$ -Proteobacteria *Pelagibius* (5% e 14% nos locais Horta e Boco, respetivamente,) e *Labrenzia* (2% e 18% nos locais Horta e Boco, respetivamente), foram os únicos encontrados nos dois locais, em todas as amostras. *Pelagibius* inclui bactérias de Gram negativo, heterotróficas, estritamente aeróbias, halotolerantes, encontradas principalmente na coluna de água em zonas costeiras. A espécie mais comum é *Pelagibius litoralis*<sup>81</sup> e à data deste trabalho, não foi encontrado nenhum registo de associação deste género com plantas.



**Figura 20** – Afiliação taxonômica e abundância relativa dos ASVs identificados ao nível do gênero, nas comunidades de bactérias endofíticas de *S. ramosissimos* locais Horta e Boco. NA - sequencias não atribuídas a gênero. 67-14 corresponde a uma categoria dentro da ordem Solirubrobacterales (Actinobacteria). KD4-96 corresponde a uma categoria do filo Chloroflexi. SCGC\_AAA011-D5 corresponde a uma categoria não classificada do filo Nanoarchaeota.

*Labrenzia* (família *Rhodobacteraceae*), cuja espécie mais comum é *Labrenzia alexandrii*, inclui bactérias halófilas de habitats marinhos. Ocorrem em vida livre ou associadas a ostras ou halófitas, como *Arthrocnemum macrostachy*<sup>82</sup>. A capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana foi reportada em espécies de *Labrenzia* associadas a corais e esponjas marinhas<sup>83</sup>. *Marinobacter* (4%-22%) foi encontrado em todas as amostras do local Boco mas em nenhuma do local Horta. Ocorre em diversos ambientes marinhos e terrestres de elevada salinidade. Tem a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos e sequestrar elementos inorgânicos (e.g Fe, As, Mn) em condições aeróbias ou anaeróbicas sendo considerada interessante para aplicações de biorremediação<sup>84</sup>. Pelo contrário, *Rhodomicrobium* (6%-12%) foi encontrada em todas as

amostras do local Horta e em nenhuma amostra do local Boco. São bactérias termófilas, foto-heterotróficas<sup>77</sup>. Foram também detetados géneros pertencentes às famílias *Cellobacteriaceae*, *Sandaracinaceae*, *Devosiaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Fibrobacteraceae*, *Euzebyaceae*, e às classes *Caldilineaceae* e *Acidimicrobiia*, cujos membros não são cultiváveis.

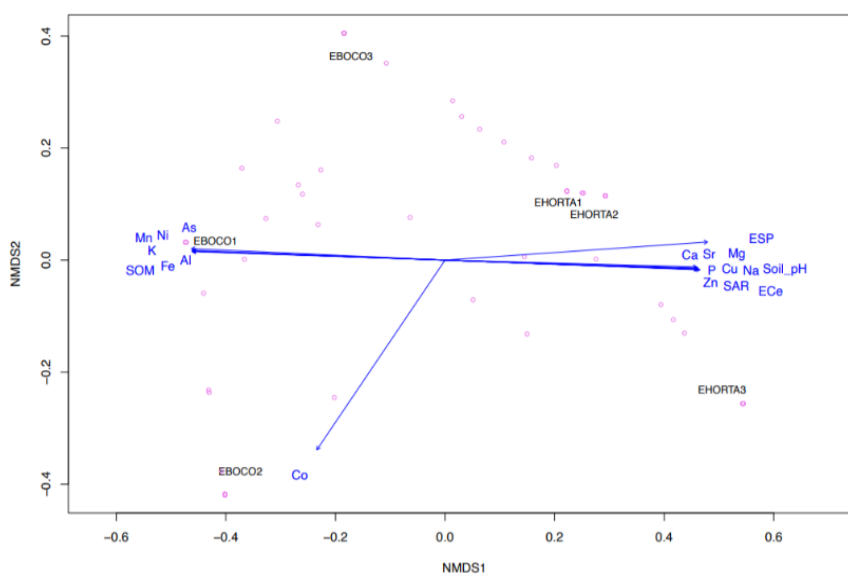


**Figura 21** – Abundância relativa de géneros e famílias das ASVs diferentemente representadas nas comunidades endofíticas da raiz de *Salicornia ramosissima* dos locais Horta e Boco.

A análise com DESeq2 ( $P = 0,05$ ) do total de ASVs obtidos, permitiu identificar 13 ASVs para as quais a abundância relativa foi significativamente diferente nos locais Horta e Boco (Anexo 4). As ASVs mais associadas ao local Boco são afiliadas aos gêneros *Marinobacter*, *Microscilla*, *Oceanicola*, *Marixanthomonas* e membros não classificados das famílias *Sandarinaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae* e *Euzebyaceae*. As ASVs enriquecidas no local da Horta correspondem aos gêneros *Rhodocrobium*, *Erythrobacter*, *Pelagibius* e a membros não classificados das famílias *Pirellulaceae* e *Solirubrobacterales* (Figura 21). O número baixo de ASVs cujas abundâncias relativas foram significativamente diferentes entre locais, concorda com resultados de outros estudos, que mostraram grande semelhança entre as comunidades bacterianas associadas a vários compartimentos do fitobioma de plantas da família *Salicornioideae*, colhidas em diferentes locais (Espanha e Chile)<sup>85</sup>, o que aponta para fatores relacionados com a planta, e não do ambiente, como determinantes da composição do seu microbioma. A escassez de diferenças estatisticamente significativas evidenciada pela análise DESeq2 (Figura 21) e pelas análises de diversidade beta (Figura 15) pode resultar do facto de neste trabalho, estar a ser analisado apenas a endosfera da raiz. No entanto, a análise fina das famílias e gêneros dominantes (Figuras 19 e 20), assim como o elevado número de ASVs de ocorrência exclusiva em cada um dos locais, indica que há diferenças subtis na composição das comunidades, nomeadamente em taxa minoritários, que podem representar respostas a propriedades específicas do solo. No sentido de procurar relações entre a estrutura da comunidade bacteriana endofítica total e fatores físico-químicos do sedimento, foi feita a análise de ordenação multidimensional não métrica (NMDS).

No gráfico de NMDS (Figura 22), as comunidades endofíticas das amostras de cada local aparecem separadas relativamente ao eixo das abcissas. As comunidades de bactérias endofíticas do local Boco mostraram associação com as concentrações de Mn, Ni, As, Co, Al, K e matéria orgânica (SOM). A comunidade bacteriana endofítica do local Horta mostrou relação com as concentrações de Ca, Sr, Zn, Mg, Cu, P e Na e ainda com o pH e com a condutividade elétrica (ECe).





**Figura 22** – Representação da análise de ordenação multidimensional não métrica (NMDS) da composição em AVs ASVs (pontos violeta) e dos descritores físico-químicos dos sedimentos e água intersticial (Tabelas 2 e 3).

### 3.4.3. Comunidades *versus* isolados: relação com fatores físico-químicos

Como esperado, a composição taxonômica revelada pela análise independente de cultivo foi diferente obtida através da fração cultivável. Os Bacilli foram abundante entre os isolados e tiveram baixa representação na comunidade total. A abundância relativa de  $\alpha$ -Proteobacteria na comunidade total foi muito elevada, contrastando com a sua representação na coleção de isolados (1 OTU). No entanto, relacionando os resultados da análise NMDS da comunidade total (Fig. 22) com a análise equivalente feita sobre as coleções de isolados obtidas pela abordagem dependente de cultivo (Fig. 11), verificam-se padrões comuns. Os elementos Zn e Ca se relacionam com a fração cultivável e com a comunidade endofítica total do local Horta e que as concentrações de Al, As, Fe, Mn e Ni e com o teor de matéria orgânica (SOM) estão relacionadas com a diversidade das comunidades no Boco.

A influência dos parâmetros relacionados com a concentração de sais, como salinidade, ECE, SAR e ESP aponta para comunidades endofíticas mais diversas na endosfera da raiz de *S. ramosissima* de locais mais salinos. A comunidade correspondente

à fração cultivável apresentou índices de diversidade mais altos nos locais Santiago e Horta e a comunidade total, no local Horta. Estes resultados contradizem muitos estudos de ecologia microbiana de solos e rizosferas que o stresse salino afeta negativamente a diversidade do microbiota<sup>86,87</sup>. Os resultados do nosso estudo, indicam que as comunidades cultiváveis e não cultiváveis da endosfera da halófito *S. ramosissima* encontram-se bem adaptadas às condições de salinidade do habitat natural da planta, o que também pode ser um reflexo da existência de relações mais complexas de interdependência e benefício mútuo entre as bactérias e plantas, sujeitas a condições ambientais adversas.

Estudos de ecologia microbiana de rizosferas tem apontado a disponibilidade em carbono orgânico como um dos mecanismos de regulação da densidade e diversidade bacteriana na rizosfera. Foi observada uma correlação positiva entre o conteúdo em carbono orgânico e a abundância de Proteobacteria na rizosfera de cevada e tomate<sup>88</sup>. No presente trabalho,  $\gamma$ -Proteobacteria foi mais abundante na endosfera de plantas de locais mais ricos em matéria orgânica (Boco) e  $\alpha$ -Proteobacteria, nas plantas dos locais mais salinos (Horta), com menos matéria orgânica e com teores mais elevados de Ca, P, Mg, Cu Sr e Zn. Um estudo recente demonstrou que as  $\alpha$ -Proteobacteria contribuem para o aumento da disponibilidade de Ca, Fe, Mg, Mn e Cu em solo agrícola<sup>89</sup> o que suporta a hipótese de uma relação de efeito recíproco entre a composição das comunidades bacterianas e o perfil elementar dos sedimentos.

## 4. Conclusão

Neste trabalho foi possível identificar a composição das comunidades bacterianas endofíticas cultiváveis e não cultiváveis, associadas à endosfera das raízes de *S. ramosissima* e relacionar a sua distribuição com o contexto físico-químico do ambiente sedimentar. A salinidade não mostrou afetar negativamente a diversidade de endófitos de *S. ramosissima*.

Este estudo mostrou que as classes Bacilli e  $\gamma$ -Proteobacteria foram as mais representadas na coleção de isolados halotolerantes da endosfera, e a análise independente de cultivo mostrou que as classes  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria e Bacteroidia dominam na comunidade total.

Os resultados apontam para que as comunidades endofíticas sejam mais diversas nas plantas expostas a sedimentos mais salinos. Foram identificadas espécies bacterianas já reportadas em ambientes marinhos e em microbiomas de halófitas, incluindo *S. ramosissima*. No entanto, a identificação de ASVs por métodos independentes de cultivo permitiu detetar espécies potencialmente benéficas para o crescimento e atenuação do stresse salino, não representadas nas coleções de isolados, e que reforçam a hipótese de uma contribuição das bactérias endofíticas para os mecanismos de adaptação de halófitas ao stresse salino.

Assim, métodos independentes de cultivo representam instrumentos valiosos na compreensão das relações complexas entre bactérias endofíticas e complementam as abordagens dependentes de cultivo na exploração do enorme potencial biotecnológico destes microrganismos.

## 5. Referências

- 1 - Leach, J. E., Triplett, L. R., Argueso, C. T., & Trivedi, P. (2017). Communication in the Phytobiome. *Cell*, 169(4), 587–596. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.025
- 2 - Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *The New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. doi:10.1111/nph.13312
- 3 - Snoeijsbos, M., Cárdenas, M., Guevara-Suarez, M., Bernal, A., Jiménez, P., & Restrepo, S. (2019). Phytobiomes, the Reason Why Microbiologists and Botanists Should Work Together. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 585–618). American Cancer Society. doi:10.1002/9781119312994.apr0699
- 4 - Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 31. doi:10.1186/s40168-015-0094-5
- 5 - Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell host & microbe*, 17(5), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>
- 6 - Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., & Kao-Kniffin, J. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME journal*, 9(4), 980–989. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.196>
- 7 - Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00491
- 8 - Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188–196. doi: 10.1016/j.mib.2017.07.001

- 9 - Baltrus, D. A. (2020). Bacterial dispersal and biogeography as underappreciated influences on phytobiomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 37–46. doi: 10.1016/j.pbi.2020.02.010
- 10 - Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 193–203. doi:10.1007/s11274-009-0159-3
- 11 - Marques, J. M., da Silva, T. F., Vollú, R. E., de Lacerda, J. R. M., Blank, A. F., Smalla, K., & Seldin, L. (2015). Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Applied Soil Ecology*, 96, 273–281. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.08.020
- 12 - Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- 13 - Afzal, M., Khan, Q. M., & Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117, 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>
- 14 - Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- 15 - Szymańska, S., Borruso, L., Brusetti, L., Hulisz, P., Furtado, B., & Hryniewicz, K. (2018). Bacterial microbiome of root-associated endophytes of *Salicornia europaea* in correspondence to different levels of salinity. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(25), 25420–25431. doi:10.1007/s11356-018-2530-0
- 16 - Maropola, M. K. A., Ramond, J.-B., & Trindade, M. (2015). Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *Journal of Microbiological Methods*, 112, 104–117. doi: 10.1016/j.mimet.2015.03.012

- 17 - Etesami, H., & Beattie, G. A. (2018). Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops. *Frontiers in Microbiology*, 9, 148. doi:10.3389/fmicb.2018.00148
- 18 - Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *The New Phytologist*, 179(4), 945–963. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x
- 19 - Silva, H., Caldeira, G., & Freitas, H. (2007). *Salicornia ramosissima* population dynamics and tolerance of salinity. *Ecological Research*, 22(1), 125–134. doi:10.1007/s11284-006-0008-x
- 20 - Pérez-Romero, J. A., Idaszkin, Y. L., Barcia-Piedras, J.-M., Duarte, B., Redondo-Gómez, S., Caçador, I., & Mateos-Naranjo, E. (2018). Disentangling the effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the halophyte *Salicornia ramosissima* J. Woods physiological performance under optimal and suboptimal saline conditions. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 127, 617–629. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.041
- 21 - Furtado, B. U., Gołębiewski, M., Skorupa, M., Hulisz, P., & Hrynkiewicz, K. (2019). Bacterial and Fungal Endophytic Microbiomes of *Salicornia europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(13). doi:10.1128/AEM.00305-19
- 22 - Shi, Y., Lou, K., Li, C., Wang, L., Zhao, Z., Zhao, S., & Tian, C. (2015). Illumina-based analysis of bacterial diversity related to halophytes *Salicornia europaea* and *Suaeda aralocaspica*. *Journal of Microbiology*, 53(10), 678–685. doi:10.1007/s12275-015-5080-x
- 23 - Pedro, C. A., Santos, M. S. S., Ferreira, S. M. F., & Gonçalves, S. C. (2013). The influence of cadmium contamination and salinity on the survival, growth and phytoremediation capacity of the saltmarsh plant *Salicornia ramosissima*. *Marine Environmental Research*, 92, 197–205. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.018
- 24 - Yamamoto, K., Shiwa, Y., Ishige, T., Sakamoto, H., Tanaka, K., Uchino, M., Tanaka, N., Oguri, S., Saitoh, H., & Tsushima, S. (2018). Bacterial Diversity Associated with the Rhizosphere and Endosphere of Two Halophytes: *Glaux maritima* and *Salicornia europaea*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2878. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02878>

- 25 - Tian, X.-Y., & Zhang, C. S. (2017). Illumina-Based Analysis of Endophytic and Rhizosphere Bacterial Diversity of the Coastal Halophyte *Messerschmidia sibirica*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2288. doi:10.3389/fmicb.2017.02288
- 26 - Qin, S., Feng, W. W., Zhang, Y. J., Wang, T. T., Xiong, Y. W., & Xing, K. (2018). Diversity of Bacterial Microbiota of Coastal Halophyte *Limonium sinense* and Amelioration of Salinity Stress Damage by Symbiotic Plant Growth-Promoting Actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and environmental microbiology*, 84(19), e01533-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>
- 27 - Davy, A. J., Bishop, G. F., & Costa, C. S. B. (2001). *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball & Tutin, *S. nitens* P.W. Ball & Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball & Tutin and *S. dolichostachya* Moss). *Journal of Ecology*, 89(4), 681–707. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00607.x>
- 28 - Ameixa, O. M. C. C., Marques, B., Fernandes, V. S., Soares, A. M. V. M., Calado, R., & Lillebø, A. I. (2016). Dimorphic seeds of *Salicornia ramosissima* display contrasting germination responses under different salinities. *Ecological Engineering*, 87, 120–123. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.11.019
- 29 - Patel, S. (2016). *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech*, 6(1). doi:10.1007/s13205-016-0418-6
- 30 - Ferreira, D., Isca, V. M. S., Leal, P., Seca, A. M. L., Silva, H., de Lourdes Pereira, M., Pinto, D. C. G. A. (2018). *Salicornia ramosissima*: Secondary metabolites and protective effect against acute testicular toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(1), 70–80. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.04.012
- 31 - Dias, J. M., & Lopes, J. F. (2006). Implementation and assessment of hydrodynamic, salt and heat transport models: The case of Ria de Aveiro Lagoon (Portugal). *Environmental Modelling & Software*, 21(1), 1–15. doi: 10.1016/j.envsoft.2004.09.002
- 32 - Lopes, J., Silva, C., & Cardoso, A. (2008). Validation of a water quality model for the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *Environmental Modelling & Software*, 23(4), 479–494. doi: 10.1016/j.envsoft.2007.07.001

- 33 - Barillot, C. D. C., Sarde, C. O., Bert, V., Tarnaud, E., & Cochet, N. (2013). A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology*, 63(2), 471–476. doi:10.1007/s13213-012-0491-y
- 34 - Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., & Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. – community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, 192, 37–51. doi: 10.1016/j.micres.2016.05.012
- 35 - Schulte, E. E., & Hopkins, B. G. (2015). Estimation of Soil Organic Matter by Weight Loss-On-Ignition. In F. R. Magdoff, M. A. Tabatabai, & E. A. Hanlon (Eds.), *SSSA Special Publications* (pp. 21–31). Madison, WI, USA: Soil Science Society of America. doi:10.2136/sssaspecpub46.c3
- 36 - Zaman, M., Shahid, S. A., & Heng, L. (2018). *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques*. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-96190-3
- 37 - Sonmez, S., Buyuktas, D., Okturen, F., & Citak, S. (2008). Assessment of different soil to water ratios (1:1, 1:2.5, 1:5) in soil salinity studies. *Geoderma*, 144(1–2), 361–369. doi: 10.1016/j.geoderma.2007.12.005
- 38 - Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., & Hakenbeck, R. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research*, 20(13), 3479–3483. <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>
- 39 - R Development Core Team (2014) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.



- 40 - Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., (2019). *vegan*: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. Cran R.
- 41 - Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- 42 - Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., Connor, R., Fiorini, N., Funk, K., Hefferon, T., Holmes, J. B., Kim, S., Kimchi, A., Kitts, P. A., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., Marchler-Bauer, A., Phan, L., Schneider, V. A., ... Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 47(D1), D23–D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- 43 - Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- 44 - McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). *phyloseq*: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- 45 - Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755
- 46 - Heuer, H.; Wieland, G.; Schönfeld, J.; Schönwälder, A.; Gomes, N.C.M.; Smalla, K. (2001): Bacterial community profiling using DGGE of TGGE analysis. In: Rochelle, P.A. (Hrsg.): *Environmental molecular microbiology. Protocols and applications*, 177-190.

- 47 - Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5(10), 1571–1579. doi:10.1038/ismej.2011.41
- 48 - Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. doi:10.1093/nar/gks808
- 49 - Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- 50 - Schubert, M., Lindgreen, S., & Orlando, L. (2016). AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Research Notes*, 9(1), 88. doi:10.1186/s13104-016-1900-2
- 51 - Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- 52 - Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869
- 53 - McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3), 610–618. doi:10.1038/ismej.2011.139

- 54 - Janssen, S., McDonald, D., Gonzalez, A., Navas-Molina, J.A., Jiang, L., Xu, Z.Z., Winker, K., Kado, D.M., Orwoll, E., Manary, M., Mirarab, S., Knight, R., (2018). Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information. *mSystems*. <https://doi.org/10.1128/msystems.00021-18>
- 55 - Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- 56 - McMurdie, P. J., & Holmes, S., (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- 57 - Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- 58 - Wickham, H. (2009). *ggplot2*. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-98141-3
- 59 - Soil Survey Division Staff. "Soil survey manual. (1993). Chapter 3". Soil Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 18. Retrieved 2017-05-15.
- 60 - Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M. C., Montalvo-Rodríguez, R., & Ventosa, A. (2009). Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Halomonadaceae, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 2), 397–405. doi:10.1099/ijs.0.001461-0
- 61 - Ceylan, S., Yilan, G., Akbulut, B. S., Poli, A., & Kazan, D. (2012). Interplay of adaptive capabilities of *Halomonas* sp. AAD12 under salt stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(1), 45–52. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.030

- 62 - Desale, P., Patel, B., Singh, S., Malhotra, A., & Nawani, N. (2014). Plant growth promoting properties of *Halobacillus* sp. and *Halomonas* sp. in presence of salinity and heavy metals: Plant growth promotion in presence of salinity and heavy metals. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 781–791. doi:10.1002/jobm.201200778
- 63 - Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., Złoch, M., Ruppel, S., & Hryniewicz, K. (2016). Metabolic potential and community structure of endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L. *Microbiological Research*, 182, 68–79. doi: 10.1016/j.micres.2015.09.007
- 64 - Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 19(2), 249–256. <https://doi.org/10.1111/plb.12521>
- 65 - Cardoso, P., Rigal, F., & Carvalho, J. C. (2015). BAT – Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(2), 232–236. doi:10.1111/2041-210X.12310
- 66 - Wagner, K., Krause, K., Gallegos-Monterrosa, R., Sammer, D., Kovács, Á. T., & Kothe, E. (2019). The Ectomycorrhizospheric Habitat of Norway Spruce and *Tricholoma vaccinum*: Promotion of Plant Growth and Fitness by a Rich Microorganismic Community. *Frontiers in Microbiology*, 10, 307. doi:10.3389/fmicb.2019.00307
- 67 - Lagier, J. C., Khelaifia, S., Azhar, E. I., Croce, O., Bibi, F., Jiman-Fatani, A. A., Yasir, M., Helaby, H. B., Robert, C., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). Genome sequence of *Oceanobacillus picturae* strain S1, an halophilic bacterium first isolated in human gut. *Standards in genomic sciences*, 10, 91. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0081-2>
- 68 - El-Tarabily, K. A., & Youssef, T. (2010). Enhancement of morphological, anatomical and physiological characteristics of seedlings of the mangrove *Avicennia marina* inoculated with a native phosphate-solubilizing isolate of *Oceanobacillus picturae* under greenhouse conditions. *Plant and Soil*, 332(1–2), 147–162. doi:10.1007/s11104-010-0280-y

- 69 - Navarro-Torre, S., Carro, L., Rodríguez-Llorente, I. D., Pajuelo, E., Caviedes, M. Á., Igual, J. M., ... Montero-Calasanz, M. del C. (2018). *Kushneria phyllosphaerae* sp. nov. and *Kushneria endophytica* sp. nov., plant growth promoting endophytes isolated from the halophyte plant *Arthrocnemum macrostachyum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2800–2806. doi:10.1099/ijsem.0.002897
- 70 - Silva, M. J. C. da Junior, S. F. P., Junior, K. F., Nascimento, V. X., Medeiros, A. S. de, Silva, S. J. C. da, ... Ana, A. E. G. S. (2020). IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan. *Australian Journal of Crop Science*, (14(03):2020), 537–544. doi:10.21475/ajcs.20.14.03. p2239
- 71 - Lafi, F. F., Ramirez-Prado, J. S., Alam, I., Bajic, V. B., Hirt, H., & Saad, M. M. (2017). Draft Genome Sequence of Plant Growth–Promoting *Micrococcus luteus* Strain K39 Isolated from *Cyperus conglomeratus* in Saudi Arabia. *Genome Announcements*, 5(4), e01520-16, e01520-16. doi:10.1128/genomeA.01520-16
- 72 - Yang, H., Hu, J., Long, X., Liu, Z., & Rengel, Z. (2016). Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke. *Scientific Reports*, 6(1), 20687. doi:10.1038/srep20687
- 73 - Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., & Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in microbiology*, 11, 468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
- 74 - Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J. M., & Velázquez, E. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PloS one*, 6(5), e20223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020223>
- 75 - Gavriilidou, A., Gutleben, J., Versluis, D., Forgiarini, F., van Passel, M. W. J., Ingham, C. J., ... Sipkema, D. (2020). Comparative genomic analysis of Flavobacteriaceae: insights into carbohydrate metabolism, gliding motility and secondary metabolite biosynthesis. *BMC Genomics*, 21(1), 569. doi:10.1186/s12864-020-06971-7

- 76 - Spring, S., Scheuner, C., Göker, M., & Klenk, H. P. (2015). A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Frontiers in microbiology*, 6, 281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00281>
- 77 - Aion, H., Tan, C.J., & Vikineswary, S. (2006). Biological Characterization of *Rhodomicrobium vannielii* Isolated from a Hot Spring at Gadek, Malacca, Malaysia. *Malaysian Journal of Microbiology*.
- 78 - Singh, H., Kaur, M., Kaur, L., Sharma, S., Mishra, S., Tanuku, N. R. S., & Pinnaka, A. K. (2018). *Bacillus lacus* sp. nov., isolated from a water sample of a salt lake in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 801–809. doi:10.1099/ijsem.0.002588
- 79 - Liao, H., Lin, X., Li, Y., Qu, M., & Tian, Y. (2020). Reclassification of the Taxonomic Framework of Orders Cellvibrionales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, and Alteromonadales in Class Gammaproteobacteria through Phylogenomic Tree Analysis. *MSystems*, 5(5), mSystems.00543-20, e00543-20. doi:10.1128/mSystems.00543-20
- 80 - Talebi Atouei, M., Pourbabae, A. A., & Shorafa, M. (2019). Alleviation of Salinity Stress on Some Growth Parameters of Wheat by Exopolysaccharide-Producing Bacteria. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(5), 2725–2733. doi:10.1007/s40995-019-00753-x
- 81 - Choi, D. H., Hwang, C. Y., & Cho, B. C. (2009). *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family Rhodospirillaceae isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 818–823. doi:10.1099/ijms.0.002774-0
- 82 - Camacho, M., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Klenk, H. P., & Montero-Calasanz, M. (2016). *Labrenzia salina* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 5173–5180. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001492>

- 83 - Amiri Moghaddam, J., Dávila-Céspedes, A., Alanjary, M., Blom, J., König, G., & Schäberle, T. (2019). Genome Analysis of the Marine Bacterium *Labrenzia* sp. Strain 011, a Potential Protective Agent of Mollusks. *Data*, 4(1), 33. doi:10.3390/data4010033
- 84 - Handley, K. M., & Lloyd, J. R. (2013). Biogeochemical implications of the ubiquitous colonization of marine habitats and redox gradients by *Marinobacter* species. *Frontiers in microbiology*, 4, 136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00136>
- 85 - Mora-Ruiz, M. del R., Font-Verdera, F., Díaz-Gil, C., Urdiain, M., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., ... Rosselló-Móra, R. (2015). Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily *Salicornioideae* (*Amaranthaceae*). *Systematic and Applied Microbiology*, 38(6), 406–416. doi: 10.1016/j.syapm.2015.05.004
- 86 - Omar Rueda-Puente, E., Renganathan, P., Farmohammadi, S., Moghaddam, A., & Zakeri, O. (2013). Plant growth promoting bacteria associated to *Salicornia* rhizosphere in bandar Abbas, Iran. *Proceedings of 13th international conference on environmental science and technology*
- 87 - Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316–323. doi: 10.1016/j.iswcr.2015.11.003
- 88 - Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., & Mimmo, T. (2016). The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 39–48. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.002
- 89 - Zhang, D., Ge, S., Wang, C., Jiang, Y., Li, X., Xia, S., ... Wang, X. (2020). The relationship between soil bacteria and metal nutrient availability for uptake of apple trees in Chinese orchards. *Plant Growth Regulation*, 92(2), 181–193. doi:10.1007/s10725-020-00629-w

# **ANEXOS**



**Anexo 1 - Lista de OTUs obtidos e a sua identificação**

	Boco	Horta	Santiago	Identidade	GeneBank Accession number	% Similaridade com o isolado mais relacionado	Origem do isolado (GeneBank Accession number)
<b>Alphaproteobacteria</b>							
otu1	2	0	0	<i>Thalassospira lohafexi</i>	MT981729	100	Isolado do Oceano Antártico (GU584152)
<b>Gammaproteobacteria</b>							
otu2	1	0	0	<i>Halomonas taeanensis</i>	MT981730	100	Isolado de salina na Coreia (GenBank: AY671975)
otu4	3	0	0	<i>Providencia rettgeri</i>	MT981732	99.6	Isolado do Caule da planta: <i>Abutilon indicum</i> na Índia (LCVM01000154)
otu12	0	1	0	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	MT981739	99.7	Isolado endofita da planta: <i>Brassica napus</i> (NR_121739)
otu14	0	1	0	<i>Pseudomonas oryzae</i>	MT981740	99.9	Estirpe tipo IAM:1568 isolado de solo (NR_115005)
otu16	0	3	0	<i>Pseudomonas juntendi</i>	MT981742	99.8	Isolado de pacientes em Jopó (MK680061)
otu20	0	0	1	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	MT981752	98.7	Isolado halofílico de lago salino na Antártica (NR_114902)
otu22	0	0	5	<i>Kushneria phyllosphaerae</i>	MT981751	100	Bacteria endofítica isolada da planta <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> (KU320856)
otu23	0	0	3	<i>Salinicola halophyticus</i>	MT981748	100	Bacteria endofítica isolada da planta <i>Halimione portulacoides</i> (NR_148661)
otu24	0	0	2	<i>Idiomarina loihiensis</i>	AE017340	99.7	Estirpe tipo L2TR(T) isolada de vulcão submarino
otu25	0	0	1	<i>Psychrobacter faecalis</i>	MT981755	100	Isolada de fezes de Pombo (AJ421528)
<b>Actinobacteria</b>							
otu3	1	0	0	<i>Brevibacterium casei</i>	MT981731	99.6	Cepa tipo da coleção DSMZ 20657 (NR_041996)
otu9	0	4	0	<i>Micrococcus luteus</i>	MT981728	99.8	Actinobacteria endofítica isolada da planta <i>Aloe vera</i> (NR_134088)
otu11	0	1	0	<i>Kocuria palustris</i>	MT981737	100	Isolado do rizoplane das folhas da planta: <i>Typha angustifolia</i> (NR_026451)

Bacilli							
otu5	3	1	2	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MT981733	99.8	Aqüicultura de fazenda de camarão, China (JOTP01000061)
otu6	2	0	0	<i>Staphylococcus xylosus</i>	MT981734	99.4	Estirpe tipo da coleção JCM2418 (NR_113350)
otu7	1	0	0	<i>Mesobacillus thioparans</i>	MT981735	100	Isolado de sistema de tratamento de efluentes (DQ371431)
otu8	1	0	0	<i>Sporosarcina koreensis</i>	MT981736	98.1	Isolado da superfície de equipamento de produção de milho de soja (NR_114283)
otu10	0	1	0	<i>Bacillus cereus</i>	MT981738	99.9	Estirpe tipo da coleção ATCC 14579 (NR_074540)
otu13	0	1	0	<i>Bacillus pakistanensis</i>	MT981741	99.7	Halotolerante isolada de minas de sal no Paquistão (NR_115005)
otu15	0	1	0	<i>Bacillus nealsonii</i>	MT981743	98.8	Estirpe tipo DSMZ 1568 isolada de instalação de nave espacial (NR_044546)
otu17	0	1	1	<i>Oceanobacillus picturae</i>	MT981745	98.6	Isolado de pinturas murais biodeterioradas (NR_028952)
otu18	0	1	0	<i>Planococcus maritimus</i>	MT981746	99.7	Isolado de água de mar de maré na Coreia (NR_025247)
otu19	0	1	0	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	MT981747	99.7	Isolado de uma ilha na Coreia (NR_043206)
otu21	0	0	2	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	MT981750	100	Estirpe tipo DSMZ 16483 isolado de cistos de <i>Artemisia franciscana</i> (AM072764)
otu26	0	0	1	<i>Gracilibacillus massiliensis</i>	MT981754	99.5	Bacteria isolada de sal de mesa (NR_149182)

**Anexo 2** - Abundância dos gêneros taxonômicos identificados (abundância > 1%) nas amostras do Boco e Horta através de sequenciamento em grande escala.

	BOCO			HORTA			Filo	Classe	Família
	1	2	3	1	2	3			
<i>SCGC_AAA011-D5</i>	0%	4%	0%	0%	0%	0%	Nanoarchaeota	Nanoarchaeia	SCGC_AAA011-D5
<i>Denitromonas</i>	0%	5%	7%	0%	8%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Rhodocyclaceae
<i>uncultured</i>	5%	11%	3%	4%	2%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionaceae
<i>Marinobacterium</i>	6%	0%	0%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitriocolaceae
<i>Marinobacter</i>	4%	7%	22%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Marinobacteraceae
<i>Marinicella</i>	5%	0%	14%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Unknown_Family
<i>Plasticumulans</i>	4%	0%	0%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Competibacteraceae
<i>Thalassospira</i>	15%	0%	6%	0%	4%	5%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Thalassospiraceae
<i>Defluviococcus</i>	0%	0%	0%	0%	0%	10%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Defluviococcaceae
<i>Pelagibius</i>	8%	5%	8%	10%	14%	13%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Kiloniellaceae
<i>Erythrobacter</i>	7%	0%	4%	13%	12%	7%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<i>Rhodomicrobium</i>	0%	0%	0%	6%	9%	12%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodomicrobiaceae
<i>Cucumibacter</i>	0%	0%	0%	0%	3%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Devosiaceae
<i>Devosiaceae</i>	4%	0%	0%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Devosiaceae
<i>uncultured</i>	0%	0%	0%	9%	3%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Devosiaceae
<i>Labrenzia</i>	8%	10%	2%	10%	18%	10%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Stappiaceae
<i>Breoghania</i>	0%	0%	0%	6%	0%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Stappiaceae
<i>Oricola</i>	0%	4%	0%	9%	5%	5%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiaceae
<i>Hoeflea</i>	0%	0%	0%	0%	3%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiaceae
<i>Rhodobacteraceae</i>	7%	0%	3%	0%	0%	0%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<i>uncultured</i>	13%	6%	13%	7%	0%	0%	Myxococcota	Polyangia	Sandaracinaceae
<i>uncultured</i>	0%	4%	0%	0%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Cyclobacteriaceae
<i>Marinoscillum</i>	3%	4%	0%	0%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Cyclobacteriaceae
<i>Fulvivirga</i>	0%	6%	7%	0%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Cyclobacteriaceae
<i>Marixanthomonas</i>	3%	0%	4%	0%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriaceae

<i>Muricauda</i>	0%	0%	0%	8%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriaceae
<i>Robiginitalea</i>	0%	5%	7%	0%	0%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriaceae
<i>Zeaxanthinibacter</i>	4%	0%	0%	6%	3%	0%	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriaceae
<i>uncultured</i>	0%	6%	0%	0%	0%	0%	Fibrobacterota	Fibrobacteria	Fibrobacteraceae
<i>uncultured</i>	1%	11%	0%	0%	0%	0%	Actinobacteriota	Actinobacteria	Euzebyaceae
<i>uncultured</i>	0%	0%	0%	0%	4%	0%	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	uncultured
<i>Illumatobacter</i>	0%	0%	0%	7%	0%	7%	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	Illumatobacteraceae
<i>Demequina</i>	0%	5%	0%	0%	0%	0%	Actinobacteriota	Actinobacteria	Demequinaceae
<i>Mycobacterium</i>	0%	4%	0%	0%	0%	0%	Actinobacteriota	Actinobacteria	Mycobacteriaceae
<i>67-14</i>	0%	0%	0%	3%	0%	11%	Actinobacteriota	Thermoleophilia	67-14
<i>Pir4_lineage</i>	4%	0%	0%	2%	9%	4%	Planctomycetota	Planctomycetes	Pirellulaceae
<i>Bythopirellula</i>	0%	0%	0%	0%	3%	0%	Planctomycetota	Planctomycetes	Pirellulaceae
<i>uncultured</i>	0%	0%	0%	0%	0%	7%	Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineaceae
<i>KD4-96</i>	0%	0%	0%	0%	0%	5%	Chloroflexi	KD4-96	KD4-96
<i>Halobacillus</i>	0%	0%	0%	0%	0%	5%	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae
<i>Bacillus</i>	0%	4%	0%	0%	0%	0%	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae

**Anexo 3 - Identificação taxonômica das ASVs comuns nos locais Horta e Boco.**

	FILO	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÉNERO
ASV107	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Teredinibacter_sp.
ASV110	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Teredinibacter_sp.
ASV204	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	NA
ASV205	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	NA
ASV208	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	NA
ASV210	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	NA
ASV549	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter
ASV552	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter
ASV638	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Stappiaceae	Labrenzia
ASV639	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Stappiaceae	Labrenzia
ASV643	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Stappiaceae	Labrenzia
ASV648	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Stappiaceae	Labrenzia
ASV672	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA
ASV676	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA
ASV698	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA
ASV763	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	NA
ASV936	Myxococcota	Polyangia	Polyangiales	Sandaracinaceae	uncultured
ASV938	Myxococcota	Polyangia	Polyangiales	Sandaracinaceae	uncultured
ASV1286	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Crocinitomicaceae	Crocinitomix

**Anexo 4 - ASVs cujas abundâncias relativas foram significativamente diferentes entre locais.**

	BOCO1	BOCO2	BOCO3	HORTA1	HORTA2	HORTA3	Família	Género
ASV8	0.01993912	0.018611167	0.030268741	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Marinobacteraceae	Marinobacter
ASV92	0.04931507	0.017210326	0.003677511	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Sandaracinaceae	uncultured
ASV46	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.040707965	0.000000000	0.082055215	Rhodomicriaceae	Rhodomicribium
ASV38	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.074690265	0.048444407	0.000000000	Kiloniellaceae	Pelagibius
ASV107	0.000000000	0.021212728	0.039603960	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Flavobacteriaceae	NA
ASV75	0.02526636	0.035621373	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Rhodobacteraceae	NA
ASV111	0.00456621	0.044826896	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Euzebyaceae	uncultured
ASV127	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.017699115	0.000000000	0.027096115	Pirellulaceae	Pir4_lineage
ASV95	0.01765601	0.026015609	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Cyclobacteriaceae	Marinoscillum
ASV80	0.03607306	0.000000000	0.019801980	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae
ASV43	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.021238938	0.01597981	0.000000000	Sphingomonadaceae	Erythrobacter
ASV122	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.018761062	0.000000000	0.021472393	Solirubrobacterales	67-14
ASV98	0.01872146	0.000000000	0.025742574	0.000000000	0.000000000	0.000000000	Flavobacteriaceae	Marixanthomonas