

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ERIKA PEÇANHA SANTORO



Microbioma de corais termo resistentes e manipulação de microrganismos benéficos para corais contra estresse térmico em *Mussismilia hispida*



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadores: Raquel Silva Peixoto, Dra.
Andrew Macrae, Dr.

RIO DE JANEIRO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

PE68m Peçanha Santoro, Erika
Microbioma de corais termo resistentes e
manipulação de microrganismos benéficos para corais
contra estresse térmico em *Mussismilia hispida* /
Erika Peçanha Santoro. -- Rio de Janeiro, 2020.
200 f.

Orientadora: Raquel Silva Peixoto.

Coorientador: Andrew Macrae.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal,
2020.

1. Recifes de coral. 2. Estresse térmico. 3.
Corais termo resistentes. 4. Microrganismos
Benéficos para Corais. 5. Manipulação de microbioma.
I. Silva Peixoto, Raquel, orient. II. Macrae,
Andrew, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a),
sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DO EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE ÉRIKA PEÇANHA SANTORO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

Aos onze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte, às 13 horas e 30 minutos, reuniu-se via videoconferência, a Banca Examinadora abaixo discriminada, para avaliação da Tese de Doutorado da aluna **Erika Peçanha Santoro**, intitulada: "Microbioma de corais termo resistentes e manipulação de microrganismos benéficos para corais contra estresse térmico em *Mussismilia hispida*" desenvolvida sob a orientação da **Profª. Raquel Silva Peixoto**. A apresentação feita pela candidata foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a tese foi (A) (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação* escritas no espaço destinado.

*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Comissão Examinadora e pela orientadora do aluno. A aluna deve ficar com uma cópia da ata e a outra deve ser entregue para a secretaria do PBV pelo Presidente da Banca.

Rio de Janeiro, 08 de dezembro de 2020.

Fernanda de Ávila Abreu



Fernanda de Ávila Abreu
Coord. Pós - Graduação
Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos
PBV - Decania / CCS
SIAPE: 2048535

Centro de Ciências da Saúde – Bloco K
Sala K2-032 – 2º andar – Cidade Universitária
CEP: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil
Tel: 3938-6676 - E-mail: pbv@ccsdecania.ufrj.br

18º Ofício de Notas - Luis Vitoriano Vieira Teixeira
Est. do Galeão 2315 Lj G - RJ - Tel: 2259-8897 - N.º 18

Reconheço por semelhança a(s) firma(s):
FERNANDA DE AVILA ABREU-304/80-EDQS80154R=
\$GFP, R

Rio de Janeiro, 11 de Janeiro de 2021 às 14:19:41
1-Em Testemunho _____ da verdade
SILVIO CARLOS DA HORA - Autorizado - SCH - 1
Firma 6,06 + FETJ 1,21 + Fundos 0,96 + ISSQN 0,31 = R\$. 8,54
EDQS80154 GFP

Consulte em <http://www3.ufrj.br/sitepublico>

Silvio Carlos da Hora
18º Ofício de Notas
Escritório Autorizado



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DO EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE ÉRIKA PEÇANHA SANTORO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

Fernanda de Ávila Abreu
Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu – Coordenadora

18^o DE



Fernanda de Ávila Abreu
Coord. Pós - Graduação
Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos
PBV - Decania / CCS
SIAPE: 2048535

Ricardo Moreira Chaloub
Dr. Ricardo Moreira Chaloub – UFRJ

Rodrigo Leão de Moura
Dr. Rodrigo Leão de Moura - UFRJ

Henrique Fragoso dos Santos
Dr. Henrique Fragoso dos Santos - UFF

Michele Klautau
Dr^a. Michele Klautau - UFRJ

Raquel Silva Peixoto
Dr^a. Raquel Silva Peixoto - UFRJ

Raquel Silva Peixoto
Dr^a. Raquel Silva Peixoto (Orientadora)

Erika Peçanha Santoro
Erika Peçanha Santoro (Doutoranda)

18^o Ofício de Notas - Luis Vitoriano Vieira Teixeira 088682AF166661
Est. do Galeão 2335 L.J.G - RJ - Tel. 2259-8997 - Nº 1510225
Reconheço por semelhança a(s) firma(s): #
FERNANDA DE AVILA ABREU-304/80-EDQS80160H=
!VTV, #=====da verdade.
Rio de Janeiro, 11 de Janeiro de 2021 as 14:21:37
1-Em Testemunho
SILVIO CARLOS DA HORA - Autorizado - SCH - 1
Firma 6.06 • FETJ 1,21 • Fundos 0,96 • 15501 0,11 = R\$ 8,54
EDQS80160 VTV
Consulte em <https://www3.ufrj.br/sistemaoficial>

Silvio Carlos da Hora
OFÍCIO DE NOTAS
Escrevente Autorizado

“Amar e mudar as coisas me interessam mais.”

Belchior

AGRADECIMENTOS/AKNOWLEDGMENT

Ao universo por eu estar vivendo no espaço e tempo que habito, seja isso chamado de Deus ou força da Natureza.

Mas como ciência nem nenhuma grande conquista não se faz sozinha, eu gostaria de agradecer à essa rede de apoio maravilhosa que fez parte da minha jornada.

Aos meus pais, Beth e Paulo, por serem meu porto e minha verdadeira representação de casa, por me apoiarem emocionalmente e financeiramente, por tanto amor e admiração, pelos mimos e comidas maravilhosas da mamãe que eu ganho toda vez que volto pra casa e por me criarem de maneira honesta e livre, o que me tornou o ser humano que sou hoje. Ao meu irmão Bruno, que sabe ser irritante como um legítimo irmão mais velho, mas também parceiro de todas as horas. Aos meus padinhos queridos, Mara e Éden, que são como se fossem meus pais, aos quais eu tenho um enorme carinho e identificação. A minha família não humana, Rufinha e Dalila, que são minha maior saudade. A todos os meus familiares, que não são poucos! Obrigada por me apoiarem e por confiarem em mim para tirarem dúvidas de biologia/microbiologia! Incluindo aqui pais emprestados, que mesmo não tendo laços sanguíneos, o carinho e amor é como se fosse! Obrigada, Flori e Rubia por me apoiarem e torcerem por mim todos esses anos!

À minha orientadora, Raquel Peixoto, por ser um exemplo que eu tenho como mulher e cientista. Eu não poderia ter feito escolha melhor do que ir trabalhar com você. A qual faz de tudo e mais um pouquinho por seus alunos, está sempre disponível por mais atarefada que esteja. Obrigada por comprar nossas ideias malucas (e dar ideias ainda mais malucas rs), por nos dar independência e espaço pra criar e ousar, por ver nossas qualidades e exaltá-las, por criar um ambiente de trabalho tão acolhedor, o qual se parece mais com uma segunda casa. Por todas essas razões que você atrai pessoas tão maravilhosas no seu time... uma vez LEMM, sempre LEMM! Obrigada por todos os brainstorms e tempo dedicado a mim. A sua paixão pela ciência e pelo o que faz, me move e me inspira! Eu fico muito feliz de ter uma mentora MULHER que é tão brilhante como você, obrigada por ser esse guia!

Ao meu Co-orientador Andrew Macrae, que me acompanha nessa trajetória desde a graduação! Viu meu crescimento como pessoa e profissional! Obrigada por me apoiar e incentivar em tantos desafios, por me ajudar inúmeras vezes com documentações prazos e burocracias. Obrigada pela parte científica, mas também pelos melhores churrascos e confraternizações que eu já fui! Ao Inglês mais brasileiro que eu conheço, meu muito obrigada!

To Chris Voolstra, who is almost a Co-advisor in this thesis. I have been learning so much from this time working with you on these two chapters of my thesis, improving my writing and narrative skills. I'm glad for this collaboration and to be able to absorb so much knowledge! Thank you for providing outstanding analyses and data interpretation, and for being available for it.

Aos muitos mestres e mentores que eu tive pelo caminho. Em especial a Angela Michelato, quem me fez despertar a paixão pela ciência. Meu muito obrigada por ser minha mentora em tantas etapas e me guiar até aqui, obrigada pela amizade e suporte. Ao Alexandre Rosado que apesar de não me orientar diretamente é uma grande inspiração para mim e tantos alunos, uma das pessoas que falam de ciência com mais paixão que eu já vi. Foram nas suas aulas que me tronei uma microbiologista ambiental. Obrigada por mostrar que é possível ser a um pesquisador incrível e ter histórias épicas de bebedeiras hahaha e continuar sendo o mais respeitado e inspirador professor do instituto! Ao professor Ricardo Chaloub, um dos meus grandes mestres, uma pessoa tão carismática que tenho um enorme carinho! Ao professor Sérgio Fracallanza, outro grande mestre que cruzou meu caminho na graduação! Ao prof Ulisses que faz muita falta no nosso Instituto de Microbiologia. E a todos os meus professores na graduação e pós-graduação, que pavimentaram esse caminho, passando todo conhecimento.

Obrigada a todos os membros da minha banca por aceitarem o convite para ser parte dessa etapa que é uma das mais importantes da minha carreira. Obrigada por se disponibilizarem para termos essa defesa de maneira virtual, devido as atuais circunstâncias.

À minha revisora, Anna Maria Mazotto, que revisou de maneira tão cuidadosa e com muita dedicação esse documento, para sair da melhor forma possível. Como sempre muito disponível e pronta para ajudar. Meu muito obrigada.

A todos os meus colaboradores que fizeram esse trabalho acontecer da melhor maneira possível. Ao Caio Caiote, amigo querido que com toda a paciência do mundo me ajudou na parte de bioinformática e estatística de parte desse projeto. Ao Ricardo Borges, pela ajuda com as análises de NMR, obrigada pela paciência e explicações químicas. Ao Ulisses e todo seu grupo em Leipzig. To Marcelo and Josh from J. Craig Venter, for being so helpful and always available. To Torsten Thomas, David Bourne and Mike Sweet, my favorite gringos and scientists, thank you for all the writing and experimental suggestions.

À todas as pessoas desse time maravilhoso que eu tenho o maior orgulho e felicidade de trabalhar junto, e que formam uma grande família! Ao grande bigode grosso Edir, pau pra toda obra, guardião das sabedorias ancestrais de Paulo de Goes. Às minhas eternas crionças, Camila e João, pupilos que são muito mais brilhantes do que eu e continuam me enchendo de orgulho e me divertindo com suas loucuras da graduação (essa última parte vale só pro João hahah)! Ao pupilo Pedro, esse garoto gênio que veio pra completar nosso time de maneira espetacular. Ao querido Gustavo, mestre dos magos dos sistemas experimentais, saídas de campo e, claro, das cervejas mais divertidas e papos eternos sobre política que sempre me acrescentam muito! Ao parceirão Lipe que está absolutamente sempre disponível e tranquilo pra qualquer momento! Aos meus chameguinhos máximos, Fluvitcho e Maria, que roubaram meu coração todinho! Ao nosso gringo querido Adam, sempre nos divertindo com os mais bizarros insights sobre o Brasil! As mulheres maravilhosas e determinadas desse lab: Bárbara, Dani, Sula e Taissa! Ao Leandro por toda a ajuda com bioinformática. Aos queridos Laene, Eikon e Anael. E meu muito obrigada especial para as minhas amigas brilhantes Caren, Júnia e

Helena. Minhas fiéis companheiras que não medem esforços para ajudar, que passaram várias noites no laboratório e em búzios rodando experimento, dias macerando coral e extraíndo DNA, fazendo milhões de meios e PCRs, e que ainda fazem tudo isso me matando de rir, tornando tudo mais fácil. Vocês são incríveis. Amo vocês, obrigada pela amizade e por tornarem isso tudo tão mais leve!!!

À minha amiga Helena, que não tenho palavras para expressar minha gratidão por a gente ter se encontrado nessa vida! A pessoa que me ensinou e continua ensinando tudo que sabe, sem vaidades sem egoísmo. Que não pestaneja para ajudar qualquer pessoa (e bichinhos) ao seu redor, sem medir esforços. Parceirona, que morou comigo por 4 meses rodando experimento e nos colocando nas mais divertidas aventuras. Aquela que incorpora Helenão pau pra toda obra, fazendo um sifão e dando ré como ninguém! Mulher incrível, brilhante como ser humano e cientista! Você é meu orgulho e inspiração. Muito obrigada amiga!

À galera do LABEM e LBSBM, por estarem sempre ali disponíveis pra um cafezinho e jogar conversa fora, ou pra emprestar marotamente algum reagente. Obrigada momentos de distração e parceria.

Ao AquaRio pela parceria e por ceder uma infraestrutura maravilhosa que nos permite avançar ainda mais na ciência. Obrigada a toda a galera que trabalha lá e nos ajuda sempre! Obrigada ao Baiano pelas colaborações em campo, Igor por zelar pelos nossos corais. Obrigada a Gabi, Carol, Bombinha, Tiê, Dani, Rodrigão e ao Valdeco, sempre super atencioso e fazendo aquele suquinho da tarde! Obrigada pessoal, por toda ajuda e momentos de descontração.

To my dear ocean team from Biosphere!! Diane, Kattie, Ty, Franklin and Kara! I'm so glad and thankful for everything I learned there, I could grow as person and professional. Thanks, Diane, for mentoring me and being so supportive. Special thanks for Franklin, meu amigo, who makes literally everything works in B2O and is the sweetest person I have ever known. Thanks Ty, for the most memorable adventures I could have there! Miss you guys! More special thanks for my friends from Tucson, those who made my life much cooler... Jake, Aaron, Eleni, Moises, Lila, Peter and all.

To all my friends from HIMB, for the most epic chapter of my life! Unfortunately thanking first and again Ty here, this friend and mentor who received me in HIMB and was the responsible for nominating my Shanana skill and turn it in the best scientific insight ever. Jokes apart, thanks for the mentoring, partnership and all the fun, thanks for introducing me to Caleigh, this amazing human being, and to the most bafudo shark-dog ever. Thanks, Ford, for receiving and supporting me during this time in Gate's lab. Thanks to all my labmates from Gate's lab, you guys have an amazing team and great energy. Special thanks for the best roomie and friend I could get in the world, Valerie. I've learned so much about love, life and friendship with you! You are one of my favorites and most adorable people in the world, I hope we can meet soon for more adventures somewhere! Love you, amiga! To my friend Mari, obrigada por me receber de braços e casa e vida abertos. Essa pessoinha mágica que sempre tem a coisa certa na mala do carro ou na

bolsa pra transformar o ambiente no melhor possível. Sou muito grata mesmo pelos momentos que compartilhamos, as aventuras que entramos, as conversas que tivemos, os jantares e mergulhos inesquecíveis! Amo a gente, e espero que nos encontremos de novo nessa ilha mágica ou aqui no Brasil. To the cutest grumpy old-man in Hawaii, Derek, thanks for all the magical moments, support and affection, thanks for turning everything more special.

Aos meus amigos de sempre e que sem o suporte e colo de cada um deles essa jornada seria mais difícil. A minha amiga, irmã, parceira Luana que vem dividindo furadas, conquistas e processos junto comigo há tantos anos, meu orgulho de mulher e pessoa. Kathleen, minha hermana cósmica que certamente nem ela nem Nicholas vieram desse planeta, obrigada amiga por tanto! Vocês me impulsionam a me conhecer melhor e explorar os lados ocultos além da minha cabecinha de cientista, obrigada por me tirar das zonas de conforto. À Re, minha gelouka baiana parceirinha de aventuras, risadas e estradas. Vini meu cientista que me dá tanto orgulho, passarinho que foi voar e conquistar seu lugar nesse mundo, mas me mata de saudade. À minha amiga de sempre, Ohana, que mesmo lá nos cafundós do Canadá me dá colo e me apoia em todas as decisões, obrigada por ser pilar! À minha parceirona mineira, Thyara, que mesmo nossos encontros sendo cada vez menos frequentes, nos reconhecemos e fortalecemos nossos laços! Obrigada por ser esse porto. Um agradecimento especial à nossa estrelinha do mar, João! Sei que você está olhando por nós de onde quer que esteja. À minha amiga Juju, sempre do meu lado, acompanhando e torcendo pelas conquistas desde a escola. À amiga lasmin, parceira que é quase meu espelho, só não é minha irmã porque nasceu um dia depois de mim, obrigada pela parceria indubitável, minha amiga. Ao meu amigo-irmão Pedro, meu parceiro de LBSBM das quais dividi as histórias mais memoráveis da vida, obrigada meu amigo. Obrigada a todos meus amigos não mencionados que fizeram/fazem parte dessa caminhada, aos amigos da escola, da graduação, do forró, do chorinho, surf e da AcroYoga. Todos nossos momentos foram essenciais pra essa jornada.

Ao mar, a música e à dança por serem elementos que me permitem conexão e alinhamento. E por último, mas não menos importante, gostaria de me acolher e agradecer a mim mesma, ao meu corpo e mente por perseverarem sãos e sadios nessa jornada. Certamente sou uma pessoa mais madura e melhor por ter contato com tantas pessoas e oportunidades como as que experienciei. Obrigada!!

RESUMO

Santoro, E.P.

Microbioma de corais termo resistentes e manipulação de microrganismos benéficos para corais contra estresse térmico em *Mussismilia hispida*

Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Os recifes de coral são ecossistemas com grande importância ecológica, biotecnológica e econômica. Apesar de toda sua importância, os recifes de coral vêm sendo ameaçados devido as consequências das mudanças climáticas. Anomalias térmicas, cada vez mais intensas e duradouras estão atingindo os corais, levando a eventos de branqueamento em massa e mortalidade sem precedentes. No entanto, diferentes graus de susceptibilidade ao estresse térmico veem sendo identificados em colônias de corais da mesma espécie, sendo algumas mais resistentes do que outras. Nesse sentido, a investigação de fatores que influenciam na resiliência e resistência de corais a estresses térmicos é de extrema importância para guiar futuras intervenções de mitigação de impactos nesses ecossistemas. A flexibilidade e composição do microbioma vem sendo apontada como fatores envolvidos na resiliência do coral à estressores ambientais. Dessa forma, o presente estudo visou: (i) investigar o limite térmico e a dinâmica do microbioma de indivíduos da espécie do coral brasileiro *M. hispida* com diferentes susceptibilidades ao branqueamento, e (ii) desenvolver um consórcio probiótico utilizando microrganismos benéficos para corais (BMC) para aumentar a resiliência ao branqueamento causado por estresse térmico, além de compreender os mecanismos envolvidos na manipulação do microbioma. Para a primeira parte do estudo, colônias do coral *M. hispida* identificadas como termo resistentes (TR) e termo sensíveis (TS) foram marcadas em Maraú, Bahia, Brasil, durante o branqueamento de 2016, causado por um evento de aumento de temperatura. Passados 2 meses após o branqueamento, as colônias marcadas foram coletadas e utilizadas em experimentos de estresse térmico (32 °C / 30,5 °C, respectivamente para TR e TS) em mesocosmos. Corais TR e TS demonstraram respostas distintas. O rendimento quântico máximo do Fotossistema II (F_v/F_m) das algas associadas a TR foi recuperado após período de recuperação a 26 °C, assim como nenhum sinal visível de dano ao tecido foi observado durante o experimento. No entanto, todos os corais TS branquearam a 30,5 °C. O microbioma de corais TS também demonstrou ser mais variável que de corais TR. Ambos TR e TS mostraram comunidades bacterianas associadas distintas, além de bioindicadores de resistência e funções virais, eucarióticas e procarióticas específicas. Genes codificadores de proteínas do fotossistema I e II, citocromo C oxidase (COX), ATPase tipo F, complexo citocromo b6 e chaperonas foram detectados em maior abundância em corais TR após estresse térmico. A maior detecção de genes associados ao fotossistema pode indicar a multiplicação de microrganismos fotossintéticos e a comunidade microbiana pode estar influenciando em tal processo, tendo em vista diferenças na flexibilidade do microbioma

entre TR e TS. A fim de avaliar a segunda pergunta desse estudo, um consórcio probiótico utilizando BMCs isolados de *M. hispida*, foi desenvolvido e testado através de outros experimentos em mesocosmo para mitigar a mortalidade de corais causada por estresse térmico. Dessa forma, um conjunto de análises “ômicas” foi realizado no início do experimento (T0), no pico de temperatura (30,5 °C; T1), no último dia de exposição à alta temperatura (30,5 °C; T2) e após o período de recuperação de 15 dias (26 °C; T3). O tratamento com BMC causou um aumento na taxa de sobrevivência dos corais em 40%, concomitante com a recuperação do desempenho fotossintético pelas algas endossimbióticas, em comparação com corais tratados com “placebo” (solução salina sem BMCs). A tolerância térmica e a sobrevivência dos fragmentos tratados com BMC foram seguidas por padrões de degradação de DMSP, manutenção de resíduos lipídicos, além de mudanças proeminentes na expressão de marcadores imunes e de estresse do coral hospedeiro. Mais notavelmente, encontramos regulação negativa da atividade da quinase que controla a cascata de apoptose em corais tratados com BMC. Esses dados demonstram que a exposição ao BMC desencadeia um processo dinâmico de reestruturação do microbioma que instiga mudanças no coral hospedeiro, evidenciado por alterações genéticas e metabólicas que eventualmente mitigam o branqueamento e mortalidade do coral. O presente estudo demonstra a importância do microbioma na resiliência e resistência de corais ao estresse térmico, destacando a manipulação de microrganismos benéficos para corais como uma intervenção eficaz para aumentar a sobrevivência de corais durante eventos de anomalias térmicas.

Palavras-chave: Recifes de coral, estresse térmico, corais termo resistentes, Microrganismos Benéficos para Corais, manipulação de microbioma.

ABSTRACT

Santoro, E.P.

Microbioma of thermo resistant corals and manipulation of beneficial microorganisms for corals in *Mussismilia hispida* to cope with thermal stress.

Coral reefs are ecosystems with great ecological, biotechnological, and economic importance. Despite their importance, coral reefs have been and are threatened by the consequences of climate change. Thermal anomalies are increasing in intensity and duration, leading to mass bleaching events and unprecedented coral mortality. Different degrees of susceptibility to thermal stress have been identified in coral colonies from the same species, with some of them being more resistant than others. In this sense, the investigation of factors which influence the resilience and resistance of corals to thermal stresses is essential to guide future interventions to mitigate the decline of these ecosystems. The flexibility and dynamics of the coral microbiome appear to be a factor involved in coral resilience. This study aimed to: (i) understand the role of the microbiome on colonies of the Brazilian coral *M. hispida* with different susceptibilities to bleaching, and (ii) develop a probiotic consortium using Beneficial Microorganisms for Coral (BMC) to increase coral resilience to thermal bleaching, while also investigating the mechanisms involved in microbiome manipulation. For the first part of the study, colonies of the *M. hispida* coral identified as thermal resistant (TR) and thermal sensitive (TS) were tagged at Maraú, Bahia, Brazil, during the 2016 thermal bleaching event. After approximately 2 months of the bleaching event, tagged colonies were sampled and used in mesocosm experiments. TR and TS corals presented different responses to the acute heat stress. The maximum quantum yield of Photosystem II (F_v / F_m) of the algae associated with TR was returned to pre-stress levels after the recovery period, as well no visible signs of tissue damage were observed during the experiment. However, all sensitive corals (TS) were bleached at 30.5 °C. Our results revealed that the TS coral microbiome was more variable than TR coral. Both the TR and TS corals had distinct bacterial communities, in addition to bioindicators of resistance and specific viral, eukaryotic and prokaryotic functions. Genes encoding for proteins of photosystem I and II, cytochrome c oxidase (COX), ATPase type F, cytochrome b6 complex and chaperones were detected in higher abundance in TR corals after thermal stress. The higher detection of genes associated with this photosystem may indicate the multiplication of photosynthetic microorganisms and the microbial community may be influencing this process, based on the differences in the microbiome flexibility between Tr and TS. In order to evaluate the second question in this study, a probiotic consortium using native *M. hispida* BMCs, as well as a saline solution placebo, were developed and tested to see if the consortium would mitigate coral mortality caused by thermal stress. Thus, a set of omics analyzes were conducted at the beginning of the experiment (T0), at the peak temperature (30.5 °C; T1), on the last day of exposure to high temperature (30.5 °C; T2) and after the 15-day recovery period (26 °C; T3). Treatment with BMC increased coral survival rates by 40%, concomitant with the recovery of photosynthetic performance by endosymbiotic algae. Thermal tolerance and the survival of fragments treated with BMC were followed by patterns of DMSP degradation, maintenance of lipidic remnants and prominent changes in the expression

of immune and stress markers in the host coral. Most notably, we found negative regulation of kinase activity that controls the apoptosis cascade in corals treated with BMC. These data demonstrate that exposure to BMC triggers a dynamic process of microbiome restructuring that instigates changes in the coral host, evidenced by genetic and metabolic changes that eventually mitigate coral bleaching and mortality. The present study demonstrates the importance of the microbiome in the resilience and resistance of corals to thermal stress, highlighting the manipulation of beneficial microorganisms for corals as an effective intervention to increase the survival of corals during of thermal anomalies events.

Keywords: Coral reefs, thermal stress, thermal resistant corals, Beneficial Microorganisms for Corals (BMCs), microbiome manipulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura geral de corais calcificadores. Fonte: Modificado de https://coral.org/coral-reefs-101/coral-reef-ecology/coral-polyps/ ; Acesso em: 27 de nov. de 2020.....	24
Figura 2: Distribuição dos recifes de corais ao redor do mundo.....	27
Figura 3: Espécies do gênero <i>Mussismilia</i>	28
Figura 4: Os três diferentes estados em que hospedeiros associados a algas simbiotes podem ser encontrados.....	31
Figura 5: Coral hospedeiro e seus microrganismos simbiotes, mostrando as interações entre os membros do holobionte.....	33
Figura 6: Representação em 3D do aquário utilizado no experimento.....	44
Figura 7: Estrutura final do mesocosmo.....	46
Figura 8: Gráfico do perfil de temperatura seguido nos experimentos com corais TR e TS.....	47
Figura 9: Cartão colorimétrico “Coral Health Chart” utilizado nas avaliações morfológicas do coral.....	48
Figura 10: Esquema da metodologia utilizada para detecção de atividade antagonista contra patógenos de corais, utilizando o método de difusão em ágar.....	58
Figura 11: Desenho experimental e o regime de temperatura dos experimentos realizados com probióticos de corais.....	65

Figuras Capítulo I

Figura 1: Differences in the microbial communities among resistant and sensitive corals in the field during (F1) and after (F2) a bleaching event. Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) (**A**), relative abundance of order taxonomy (**B**) level and diversity indexes (**C**) shows the differences in the microbial composition and dynamic of each coral phenotype along the time.....108

Figura. 2: F_v/F_m values from Sensitive (**A**) and Resistant (**D**) corals along the temperature experiment in mesocosms. Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) showing the dynamic of beta diversity microbiome from TS (**B**) TR corals (**E**) and relative abundance

of order taxonomy level of TS (C) and TR corals (F).	109
.....	109
Figure. 3: Bacterial indicators taxa of corals phenotypes in the field samples and pulse thermal stress in mesocosm experiment.....	110
Figure. 4: Distribution of significant ORFs within Viruses, Eukaryotes and Prokaryotes.....	111
Figure 5: Heatmap with mean significant open reading frames (ORFs) associated with TR (A) and TS (B).....	112
Supplementary figure 1: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundance of Resistant and Sensitive corals during the 2015/2016 mass bleaching event on July 3rd 2016 (F1) and one month after (F2).....	174
Supplementary figure 2: Mesocosm experimental design with heat pulse stress regimes for Thermal Resistant (green) and Thermal Sensitive (purple) corals showing the temperature (axis x) by day (axis y).....	175
Supplementary Figure 3: Thermal resistant and sensitive coral fragments collected before stress (T0), during stress (T1) and after stress (T2)	176
Supplementary Figure 4: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundances of Thermal Sensitive corals at the beginning of the experiment (T0) after the peak of temperature (T1) and after the recovery period (T2).....	177
Supplementary figure 5: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundance of Thermal Resistant corals at the beginning of experiment (T0) after the peak of temperature (T1) and after the recovery period (T2).....	178
Supplementary figure 6: Relative abundance from main KEGG categories mapped from ORFs from Thermal Sensitive corals and Thermal Resistant corals before the thermal stress (S0 and R0) and during the peak of temperature (S1 and R1).....	179

Figuras Capítulo II

Figure 1: (A) Experimental design and detailed temperature, BMC inoculations and sampling layout. (B) Means of F_v/F_m rate (y axis) from coral fragments treated with BMCs or placebo under high-temperature regimes (30 °C) and ambient-temperature regimes (26 °C) during the mesocosm-experiment days (x axis). (C) Heatmap based on the

bleaching score attributed to coral fragments treated with BMC or Placebo in the heat stress experiment.....153

Figure 2:(a) Relative abundance of BMC-consortium members in coral fragments treated with BMCs or placebo and exposed to heat stress (T1, $p=0.028$, T2, $p=0.0001$, T3, $p=0.265$, Kruskal-wallis), where boxes represent the relative mean abundance and the stars represent outliers. **(b)** Box-plot of Log2 Fold change of ASVs with differential abundance ($p = 0.01$) in coral fragments treated with BMCs compared with placebo-treated fragments at T1, T2 and T3. Bars with the same color scale belong to the same taxonomic family.....154

Figure 3: Heatmap of Differentially Expressed Gene (DEG) orthogroups showing KEGG annotation and significant difference (FDR $p<0.01$) in samples from the end of the experiment (T3), after 23 days of recovery at 26 °C. Orthogroups marked ** are conserved among Scleractinia, Orthogroups marked * are exclusively from *Mussismilia hispida*... 155

Figure 4: Score plot with 95% confidence ellipses showing samples clustering by PLS-DA **(A)** and color-coded Loading plot **(B)**. Boxplots provided to access semi-quantitative evaluations of the characteristic DMSP peak at 2.88 ppm **(C)** and DMSO peak at 2.58 ppm **(D)** across sampling time and treatment independently..... 156

Figure 5: Summary of the overall responses observed at the end of the 75-day mesocosm experiment, after the recovery period, comparing the process in BMC **(A)** and placebo-treated **(B)** *Mussismilia hispida* fragments..... 157

Supplementary Figure 1: Growth curve of each pBMC used to compose the consortium, plotted by optical density $\lambda = 600$ nm **(A)** and colony-forming units (CFU)/mL at \log_{10} scale **(B)**.....187

Supplementary Figure 2: NMDs by Bray-Curtis dissimilarity matrix, *Mussismilia hispida* microbiome of high temperature experiment at Time T1, T2, T3, for BMC vs placebo treatments, in high-throughput sequencing data..... 188

Supplementary Figure 3: Relative abundance of ASVs from BMC and placebo-treated coral fragments under high-temperature regime at T0, T1, T2 and T3..... 189

Supplementary Figure 4: Alpha diversity of coral microbial communities by ASV distribution, Chao1 and Shannon index of BMC and placebo treatments over the sampling time points..... 190

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores e os ciclos de temperatura utilizados para amplificação dos genes de interesse..... 60

Tabela 2: Sequência de iniciadores e ciclos de temperatura utilizados para o gene 16S rRNA. 62

Tabelas Capítulo I

Supplementary Table 1: Indicator taxa for Thermal Resistant or Thermal Sensitive corals from field samples sorted by phenotype.....180

Supplementary Table 2: Indicator taxa from field samples sorted by collecting time during the 2015/2016 mass bleaching event on July 3rd, 2016 (F1) or one month after (F2).....182

Supplementary Table 3: Indicator taxa of Thermal Sensitive corals in mesocosm experiment sorted by the beginning of experiment (T0), the peak of temperature (T1) or/and after recovery period (T2).....183

Supplementary Table 4: Indicator taxa of Thermal Resistant corals in mesocosm experiment sorted by the beginning of experiment (T0), the peak of temperature (T1) and after recovery period (T2)..... 185

Supplementary table 5: Ratios of Virus, Prokaryotes and Eukaryotes reads for each metagenomic sample.....186

Supplementary tables 6,7 and 8: Excel files

Tabelas Capítulo II

Supplementary Table 1: Bacterial consortium selected as potential BMCs. Results obtained in the assays for the presence of catalase, Gram staining, PCR for genes of interest, antagonism activity and identification of 16S rRNA gene.....191

Supplementary Table 2: Excel file

Supplementary Table 3: Sets of primers and their thermocycling used to screen BMCs.....192

Supplementary Table 4: Accession numbers in NCBI database of strains used to compose the BMC consortium.....193

LISTA DE ABREVIÇÕES

AquaRio: Aquário Marinho do Rio de Janeiro

BMC: *Beneficial Microorganisms for Corals* – Microrganismos Benéficos para Corais

CENPES: Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello

DAS Tool: *Dereplication, Aggregation and Scoring Tool*

Diving - PAM: Fluorômetro subaquático de pulso e amplitude modulada

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSP: *Dimethylsulfoniopropionate* - Dimetilsulfopropionato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

F: *forward* - senso

F_v/F_m Eficiência fotoquímica máxima

GBR: *Great Barrier Reef* - Grande Barreira de Corais

LB: Luria Bertani Broth

MA: Marine Agar

n: Número amostral

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NGS: *Next Generation Sequencing* – sequenciamento de nova geração

NMDS: Escalonamento Multidimensional Não Métrico

OD: Densidade óptica

ORF: *Open Reading frame* - Fase de leitura aberta

OTUs: Unidades taxonômicas operacionais

PAST: *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*

pb: Pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PERMANOVA: Análise de Variância Permutacional

PGPR: *Plant Growth Promoting Bacteria* - Bactérias promotoras de crescimento de planta

pH: Potencial hidrogeniônico.

R: *reverse* – anti-senso

RDP: *Ribosomal database project*

RNA: Ácido ribonucleico

RNAr: Ácido ribonucleico ribossomal

ROS: *Reactive oxygen species* – espécies reativas de oxigênio

rpm: Rotação por minuto

rrs: Gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal

SST: *sea surface temperature* – temperatura superficial do oceano

TBE: Tris/Borato/EDTA

TR: Termo resistente

TS: Termo sensível

UV: Ultravioleta

V: Volts

Sumário

1.	Introdução	24
1.1.	Corais	24
1.2.	Recifes de coral – importância e distribuição	25
1.3.	Recifes brasileiros e <i>Mussismilia hispida</i>	27
1.4.	Mudanças climáticas e impacto nos recifes de coral.....	29
1.5.	Papel dos microrganismos no holobionte coral	32
1.6.	Resistência contra estresse térmico em corais e os possíveis fatores determinantes.....	33
1.6.1.	Resposta da comunidade microbiana ao estresse térmico	34
1.7.	Manipulação do microbioma de corais como ferramenta para a conservação de recifes	36
2.	Justificativa	38
3.	Objetivos	40
3.1.	Objetivos geral.....	40
3.2.	Objetivos específicos.....	40
3.2.1.	Capítulo I - OPENING THE HEAT BOX: MULTI DOMAIN ANALYSIS REVEALS DIFFERENT FUNCTIONAL AND MICROBIAL ASSOCIATION WITH THERMAL RESISTANT AND SENSITIVE CORALS	40
3.2.2.	Capítulo II - CORAL MICROBIOME MANIPULATION ELICITS METABOLIC AND GENETIC RESTRUCTURING TO MITIGATE HEAT STRESS AND EVADE MORTALITY.....	40
4.	Materiais e Métodos	42
4.1.	Declaração ética e consentimento para participação	42
4.2.	Caracterização de colônias termo resistentes e termo sensíveis e amostragem	43
4.3.	Rodada experimental	44
4.3.1.	Estrutura do mesocosmo	44
4.3.1.	46
4.3.2.	Desenho experimental	46
4.4.	Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água	47
4.5.	Avaliação dos parâmetros de saúde do coral.....	48
4.5.1.	Avaliação morfológica	48
4.5.1.1.	Quantificação da eficiência fotossintética das algas endossimbióticas	48
4.6.	Extração e sequenciamento do gene 16S RNAr	49

4.7. Análise da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene 16S RNAr	50
4.8. Metagenoma.....	51
4.8.1. Extração e sequenciamento de DNA metagenômico	52
4.8.2. Processamento de dados de metagenômica	52
4.8.3. Recuperação de bins.....	53
4.8.4. Identificação funcional de ORFs e análise estatística	54
4.9. Coleta de colônias de <i>Mussismilia hispida</i>	56
4.10. Isolamento de bactérias de colônias termo resistentes do coral <i>Mussismilia hispida</i>	56
4.11. Triagem funcional de estirpes benéficas para corais.....	57
4.11.1. Produção de substâncias antimicrobianas	57
4.11.2. Teste de detecção da atividade da enzima sequestrante de espécies reativas de oxigênio: Catalase	58
4.11.3. Extração de DNA genômico de isolados bacterianos	59
4.11.4. Presença de genes relacionados à fixação de nitrogênio (<i>nifH</i>) desnitrificação (<i>nirK</i>) e degradação de DMSP (<i>dmdA</i>)	59
4.12. Identificação taxonômica dos candidatos a compor consórcio BMC	61
4.13. Preparação do consórcio BMC e solução Placebo.....	62
4.14. Estrutura do mesocosmo experimental	63
4.15. Desenho experimental.....	64
4.16. Avaliação dos parâmetros de saúde do coral.....	66
4.17. Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S RNAr do microbioma do coral	66
4.18. Análise da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene 16S RNAr	67
4.19. Metabolômica	68
4.20. Metatranscriptoma.....	69
4.20.1. Extração de RNA e sequenciamento	69
4.20.2. Análise dos transcritos	70
4.20.3. Avaliação de ortogrupos	71
4.20.4. Avaliação de Expressão Diferencial do transcriptoma	71
5. Resultados e Discussão	73
5.1. Capítulo I	74
Introduction	77
Results	79

<i>Different phenotypes of <i>Mussismilia hispida</i> present distinct responses to a thermal anomaly</i>	79
<i>Colonies of <i>Mussismilia hispida</i> demonstrate difference in the associated microbiome and thermal tolerance</i>	79
<i>Bacterial communities from thermal resistant corals do not shift under pulse thermal stress</i>	81
<i>Indicators taxa of thermal stress and resistance</i>	82
<i>Functional profiles and correlations changes during a thermal stress event</i> ...	83
Discussion	86
Material and Methods	90
<i>Ethics approval and consent to participate</i>	90
<i>Sampling procedures</i>	90
<i>Mesocosm design</i>	91
<i>Mesocosm experiments</i>	92
<i>Assessment of coral health parameters</i>	93
<i>Coral DNA extractions and 16S rRNA gene amplicon sequencing</i>	94
<i>16S rRNA gene analysis</i>	94
<i>Metagenomic DNA extraction and sequencing</i>	96
<i>Metagenome data processing</i>	97
<i>Identification of Open Reading Frames (ORFs) and statistical analysis</i>	98
<i>Recovery of bins</i>	100
Funding	102
Acknowledgment	102
References	103
Figures	108
5.2. Capítulo II	113
Introduction.....	116
<i>BMC-consortium selection, assembly, and experimental setup</i>	118
<i>BMC treatment contributes to increased survivorship and recovery from bleaching after acute thermal stress</i>	121
<i>Transcriptional reprogramming of stress, metabolic, and immune genes of BMC-treated coral holobionts under heat stress</i>	121
<i>Metabolic restructuring of BMC-treated coral holobionts under heat stress</i> ...	124
Discussion	125
<i>Isolation of bacteria strains from coral</i>	132
<i>Functional screening for probiotic and bacterial 16S rRNA gene sequencing</i>	132

<i>Probiotic preparation</i>	134
<i>Mesocosm experimental design</i>	135
<i>Mesocosm experiment</i>	137
<i>Assessment of coral health and microbiome</i>	138
<i>Coral microbiome data analyses</i>	140
<i>Transcriptomics Assessment</i>	142
References	147
Figuras	153
6. Conclusões gerais	158
7. Referências	160
8. ANEXO I: PATENTE DEPOSITADA	173
9. ANEXO II: MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO I	174
10. ANEXO III: MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO II	187
11. ANEXO IV: PRODUTIVIDADE ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	194
PUBLICAÇÕES	194
PRÊMIOS E BOLSAS	196
APRESENTAÇÕES	197
ORIENTAÇÕES	198
OUTRAS ATIVIDADES	199

1. Introdução

1.1. Corais

Corais são invertebrados marinhos do filo Cnidaria e com representantes distribuídos nas classes Anthozoa e Hydrozoa (RUPPERT; BARNES; FOX, 2005). No entanto, os considerados “corais verdadeiros” são aqueles pertencentes à classe Anthozoa, ordem Scleractinia inseridos na subclasse Hexacorallia. Grande parte do ciclo de vida desses animais é sésil, e a organização desses pólipos pode ser em forma de colônias ou não (VERON, 2000). Esses animais possuem duas camadas de tecido, a epiderme e a gastroderme, que são separadas por uma matriz extracelular livre de células, a mesogléia. Além disso, corais apresentam uma camada de muco produzida por células especializadas da epiderme, que atua, dentre outras funções, como uma primeira barreira de proteção desses animais (RUPPERT; BARNES; FOX, 2005). A figura 1 detalha a anatomia do pólipo e a distribuição dos diferentes micro-habitats oferecidos por cada um desses compartimentos anatômicos.

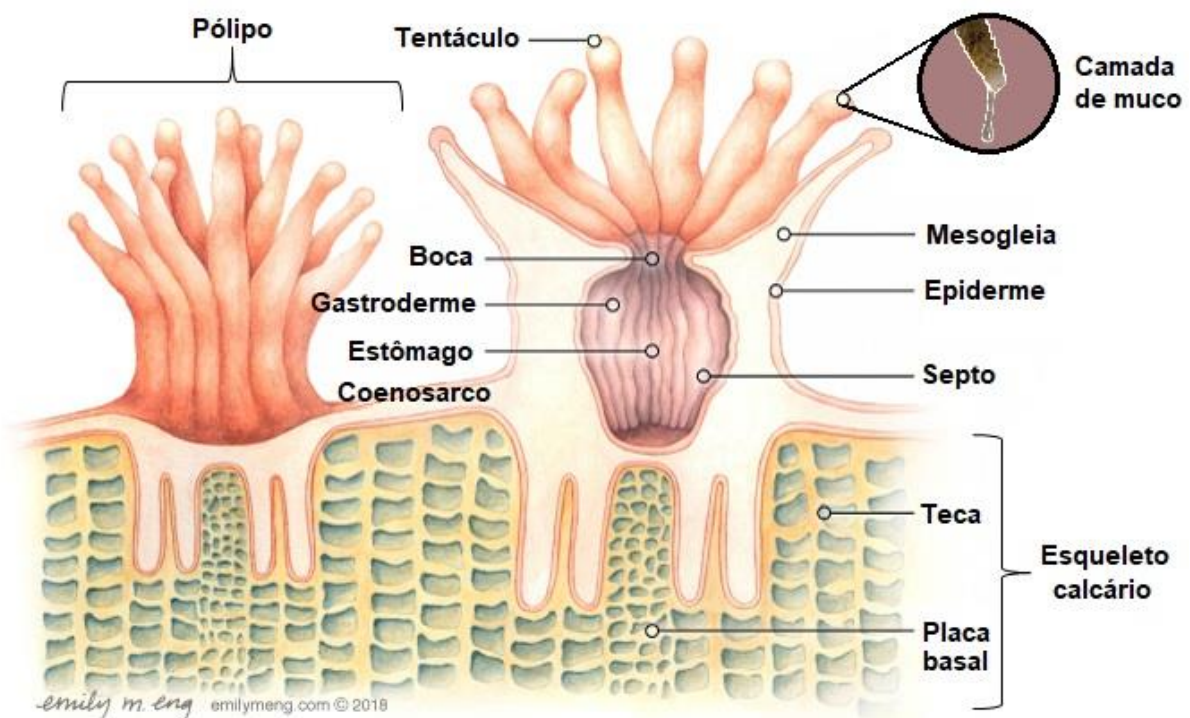


Figura 1: Representação da estrutura geral de corais calcificadores. Fonte: Modificado de <https://coral.org/coral-reefs-101/coral-reef-ecology/coral-polyps/>; Acesso em: 17 de nov. de 2020

Os corais são animais heterotróficos que se alimentam, por exemplo, de zooplâncton capturado pelos tentáculos e através de partículas aderidas ao muco (VERON, 2000). No entanto, a maior parte dos corais de águas rasas apresentam uma estratégia de mixotrofia, devido a relação simbiótica com microalgas fotossintéticas pertencentes a família Symbiodiniaceae (LAJEUNESSE et al., 2018). Nesta relação, as algas são responsáveis por fornecer, intracelularmente, grande aporte de carbono orgânico produzido a partir da fotossíntese para os corais (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). Corais e as algas endossimbióticas evoluíram e se especializaram para manter essa relação simbiótica benéfica para ambos. O hospedeiro abriga as algas dentro de estruturas chamadas simbiossomas, em sua gastroderme, fornecendo proteção, gás carbônico (CO_2) e nutrientes inorgânicos para as microalgas. Em contrapartida, até 95% dos produtos derivados da fotossíntese são translocados, sendo utilizados como fonte de energia pelo coral hospedeiro e pelas comunidades microbianas que vivem em associação (BERTUCCI et al., 2013). Além de suprir grande parte das reservas energéticas do coral, essa relação simbiótica resulta em um aumento nas taxas de calcificação do coral (MULLER-PARKER; D'ELIA; COOK, 2015). A calcificação é um processo fisiológico de deposição de carbonato de cálcio (CaCO_3) pelos corais. Esse processo é responsável pela formação do esqueleto calcário de cada colônia de coral e, em conjunto, formam grandes estruturas tridimensionais nos ambientes marinhos, os recifes de coral.

1.2. Recifes de coral – importância e distribuição

Recifes de coral são ecossistemas complexos do qual a base tridimensional é construída pela ação de organismos marinhos calcificadores. Embora outros organismos como algas calcárias (KUFFNER et al., 2008), foraminíferos e cocolitoforídeos (LANGER; SILK; LIPPS, 1997), e hidrocorais (AMARAL et al., 2008) também apresentem capacidade de depositar esqueleto calcário, são os corais escleractíneos os principais responsáveis por construir essas estruturas tridimensionais, senso assim, associados ao termo “Recifes de Coral”.

Os recifes possuem grande importância ecológica, biotecnológica, social e econômica. Apesar de representarem apenas cerca de 0,2% das áreas marinhas, os recifes de coral são os ecossistemas mais biodiversos do oceano, abrigando em torno de um terço de todas as espécies marinhas descritas (REAKA-KUDLA, 2001) e sendo comparados a florestas tropicais em termo de biodiversidade (DAVIDSON, 1998). Os ecossistemas recifais oferecem abrigo, comida e habitat para diversas espécies marinhas, além de uma importante área de ciclagem de nutrientes (MOBERG; FOLKE, 1999). Além disso, os corais podem influenciar de maneira direta ou indireta o clima local, uma vez que, tanto o hospedeiro quanto suas algas endossimbiontes, produzem o composto dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (STEFELS, 2000; RAINA et al., 2013). A degradação de DMSP por bactérias marinhas e/ou associadas aos próprios corais levam à produção de dimetilsulfeto (DMS), um importante gás volátil que induz a formação de nuvens, reduzindo, assim, os níveis de intensidade luminosa e temperatura da água (AYERS, GRAS, 1991; VALLINA, SIMO, 2007).

Adicionalmente, recifes e o conjunto de organismos que vivem neles também representam uma importante matéria-prima para prospecção de produtos farmacológicos, cosméticos e biotecnológicos (KAMM; GRUBER; KAMM, 2007). Devido à complexidade e diversidade desse ambiente, as interações entre os organismos e a competição por espaço e nutriente levam a produção de metabólitos secundários que demonstram grande potencial antibacteriano, anti-incrustante, antiviral etc. (MODOLON et al., 2020).

No âmbito econômico, recifes de coral são ecossistemas que representam uma grande área de atrativo turístico e, devido sua grande biodiversidade, fonte de renda para pesca tanto de subsistência quanto comercial (MOBERG; FOLKE, 1999). Além disso, as estruturas tridimensionais dos recifes de corais formam uma espécie de barreira contra correntes, ondas e tempestades, protegendo a costa de intemperismo (BECK, 2019). Dessa forma, o valor econômico dos recifes de coral foi estimado em cerca de US\$ 375 bilhões por ano (PANDOLFI, 2003).

Recifes coralíneos são ecossistemas que estão distribuídos em todo planeta, sendo principalmente encontrados em regiões tropicais rasas (figura 2). Os recifes podem alcançar extensão de até 2.000km, como a Grande Barreiras de Corais (GBR) na Austrália, sendo considerada a maior estrutura biológica do planeta (DE'ATH et al., 2009). No Atlântico Sul, a única área de recifes verdadeiros se encontra no Brasil, onde se distribuem por cerca de 3.000 km, em faixa descontínua, ao longo da costa (KIKUCHI et al., 2010).

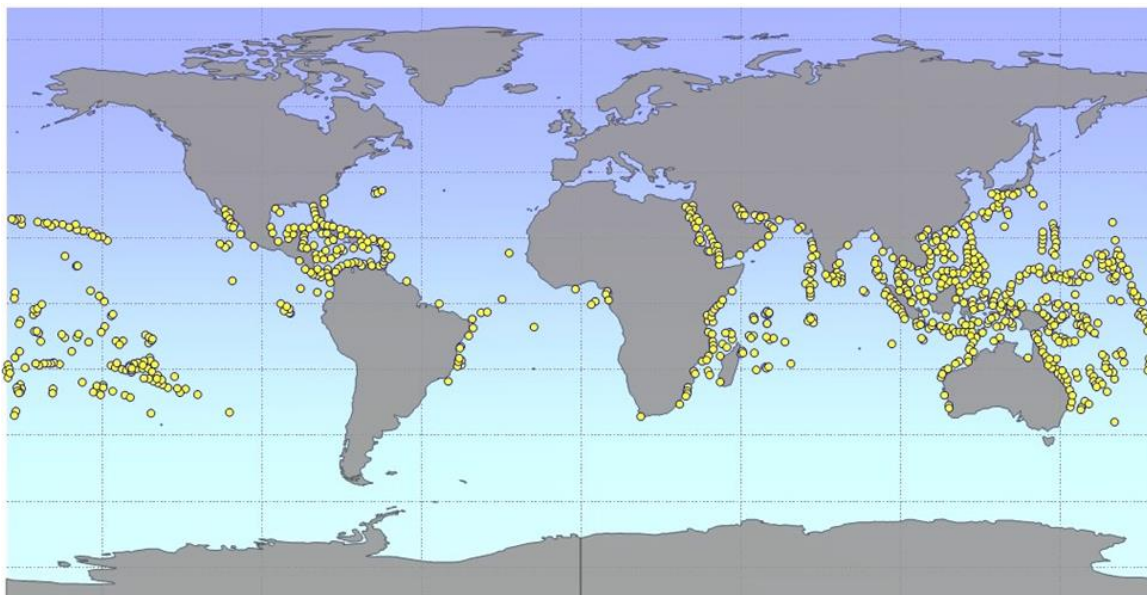


Figura 2: Distribuição dos recifes de corais ao redor do mundo. Fonte: adaptado de NOAA (https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial_corals/coral05_distribution.html), acessado em 10 de novembro de 2020.

1.3. Recifes brasileiros e *Mussismilia hispida*

O Brasil abriga os principais recifes biogênicos e corresponde a área de maior diversidade do Atlântico Sul. Um total de 28 espécies de corais de águas rasas ocorrem nessa região, sendo 23 corais e 5 hidrocorais (LEÃO et al. 2016). Os recifes de coral brasileiros apresentam uma alta taxa de endemismo por área ocupada, totalizando 8 espécies de corais que são encontrados somente na costa brasileira (MOURA, 2002; NUNES et al., 2008). Além disso, possuem estruturas únicas em formato de cogumelo, os chapeirões, que só são formadas na região de Abrolhos (LEÃO e KIKUCHI, 2005).

O gênero *Mussismilia* abriga as principais espécies formadoras de recifes no Brasil, possuindo ampla distribuição e cobertura em toda a costa brasileira, sendo também um dos gêneros mais antigos existentes de escleractíneos

(LEÃO et al., 2016). Esse gênero compreende em quatro espécies: *M. hispida*, *M. braziliensis*, *M. harttii* e *M. leptophylla* (BUDD et al, 2012) (Figura 3), sendo a espécie *M. hispida* a mais difundida ao longo da costa, ocorrendo desde o Maranhão até São Paulo, incluindo as ilhas oceânicas de Atol das Rocas (RN, Brasil), Fernando de Noronha (PE, Brasil) e Ilha da Trindade (ES, Brasil) (LEÃO e KIKUCHI, 2005; PICCIANI et al., 2016). Todas as espécies representantes desse gênero são endêmicas do Brasil, sendo sua preservação de grande preocupação, especialmente devido a proliferação de doenças e mortes em massa de representantes desse importante gênero (FRANCINI-FILHO et al, 2008).



Figura 3: Exemplo de espécies do gênero *Mussismilia*. (A) Colônia de coral *Mussismilia braziliensis*, fotografia de Gomes, 2009. (B) Colônia de coral *Mussismilia harttii*, foto retirada de Duarte et al., 2015. (C) Colônia do coral *Mussismilia hispida*, fotografia tirada por Athila Bertoncini e com identificação de Débora Pires, retirada de Castro et al., 2016. (D) Colônia de *Mussismilia leptophylla*, foto tirada pelo Coral Vivo no Parque Natural Marinho do Recife de Fora.

Os recifes brasileiros abrangem áreas com alta taxa de turbidez e sedimentação, estando sujeitos a irradiância reduzida devido à matéria orgânica dissolvida e suspensa (van WOESIK et al., 2012). Tais características, podem contribuir para o aumento da tolerância a estressores ambientais incluindo o aquecimento das águas superficiais (BASTOS et al. 2018), como observado em recifes marginais da GBR (MORGAN et al. 2017), no Caribe (GARCÍA-SAIS et al. 2017) e outras regiões (van WOESIK et al., 2012). Corais presentes em recifes com essas características tendem a apresentar maior resistência ao branqueamento, e, por isso, esses ambientes vêm sendo chamados de “refúgios das mudanças climáticas” (TEIXEIRA et al, 2019).

Apesar das características locais talvez conferirem uma certa tolerância ao branqueamento, os recifes de coral brasileiros vêm sofrendo ameaças devido a estresses locais e globais. Ao longo das últimas décadas, a detecção de

doenças vem sendo registrada principalmente devido à exposição desses corais a estressores locais como poluição e sedimentação (FRANCINI-FILHO et al., 2008, LEÃO e KIKUCHI, 2005). O aumento da temperatura superficial dos oceanos (SST), no entanto, é o principal fator que ameaça a sobrevivência desses ecossistemas em escala global. Dados provenientes dos eventos de branqueamentos em 2015-2016 e 2019 (TEIXEIRA et al, 2019; DUARTE e VILLELA, 2020) no Brasil, demonstram que apesar de serem considerados refúgios para mudanças climáticas, os corais brasileiros também estão sob ameaça devido as consequências das mudanças climáticas.

1.4. Mudanças climáticas e impacto nos recifes de coral

A ação antrópica vem ocorrendo de maneira tão intensa no planeta que alguns grupos sugeriram o termo Antropoceno para marcar a era geológica a qual estamos passando (WATERS et al, 2016; HUGHES et al., 2017). Dessa forma, são muitos os ecossistemas em declínio por consequências das mudanças climáticas ocasionadas por essas interferências, sendo os recifes de coral um dos mais afetados (HUGHES et al., 2018; CAVICCHIOLI et al., 2019). Além dos fatores de impacto locais como a sobrepesca e poluição, os recifes vêm sendo afetados principalmente pelas ações das mudanças climáticas, como a acidificação e o aumento da temperatura dos oceanos (HERON et al, 2016).

O aumento crescente das emissões de dióxido de carbono (CO_2) está diretamente relacionado à acidificação dos oceanos. Isso porque o CO_2 atmosférico reage com moléculas de água (H_2O), formando o ácido carbônico (H_2CO_3) que, por sua vez, se dissocia, liberando prótons (H^+), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). Resumidamente, os prótons de H^+ liberados por essa dissociação diminui o pH da água, aumentando a acidez; já os íons de bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) formam um sistema tampão do pH da água do mar, e seu equilíbrio é essencial para a deposição de carbonato de cálcio (CaCO_3) pelos organismos calcificadores (PANDOLFI et al., 2011). Portanto, o aumento da concentração de CO_2 atmosférico aumenta a liberação de prótons H^+ , alterando o pH e o balanço estequiométrico delicado dessa reação, o que causa interferência no processo de calcificação e torna os elementos do esqueleto calcário mais solúveis (RIES; COHEN; MCCORKLE, 2009).

O aumento da SST (*Sea Surface Temperature* ou temperatura superficial dos oceanos) é o fator mais relevante que vem levado ao branqueamento e declínio de corais nas últimas décadas (HUGHES et al. 2018). Eventos globais de branqueamento em massa (GBE – *Global Bleaching Event*) vem sendo reportados desde a década de 80, tendo sido os mais severos em 1983, 1998, 2010, 2015-2016 (HUGHES et al., 2017), afetando recifes de corais do mundo todo.

O branqueamento consiste na interrupção da relação simbiótica entre as algas fotossintéticas da família Symbiodiniaceae e o coral hospedeiro (ROSENBERG et al., 2007). Durante um período de estresse térmico e/ou luminoso, o aparato fotossintético das algas é sobrecarregado, levando a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos oxidativos na célula do coral hospedeiro e, conseqüentemente, a expulsão das algas endossimbióticas (WEIS et al, 2008). A expulsão das algas pode se dar de diferentes maneiras. Uma dessas maneiras é a apoptose ou necrose da célula do hospedeiro, o que geralmente está correlacionado a danos do tecido (DUNN et al, 2012). Outra forma de ocorrer esse processo é através da expulsão do endossimbiossoma intacto com a alga dentro (BIERI et al. 2016). Uma vez que essas algas possuem pigmentos que dão cor ao coral, uma consequência da expulsão destes microrganismos da célula é que o esqueleto branco de carbonato de cálcio se torna aparente, motivo pelo qual o processo é chamado de branqueamento (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). O branqueamento consiste em um evento reversível, desde que as condições ambientais voltem a ser favoráveis para o reestabelecimento da relação simbiótica (Figura 4). Entretanto, como as algas endossimbióticas representam grande fonte de nutriente (tópico discutido no item 1.1), períodos prolongados de estresse térmico podem levar à morte do coral (BAIRD; MARSHALL, 2002).

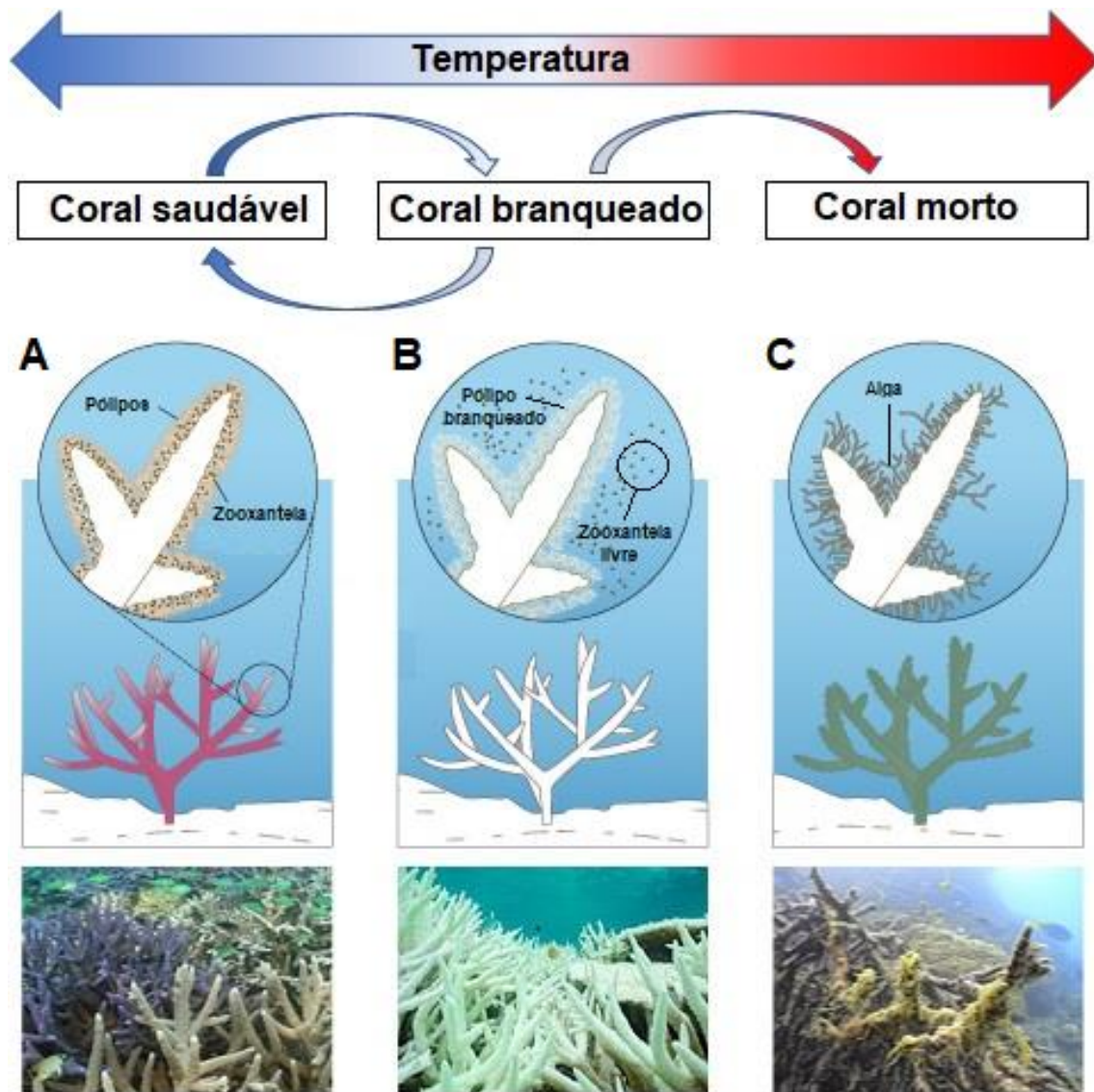


Figura 4: Os três diferentes estados em que hospedeiros associados a algas simbiotas podem ser encontrados: A) Coral saudável: zooxantelas vivem dentro de suas células epiteliais e fornecendo energia para o hospedeiro, ao mesmo tempo que recebe proteção entre outras vantagens; B) Coral branqueado: estado de saúde comprometida que ocorre, principalmente, quando há aumento de temperatura dos oceanos, e que ainda é reversível; C) Coral morto: estado irreversível, aonde a situação de branqueamento de manteve por tempo prolongado e o coral não foi capaz de retomar sua simbiose com a alga, morrendo e seu esqueleto sendo coberto por algas filamentosas. Fonte: Modificado de <https://www.markettamer.com/blog/australian-government-to-invest-half-a-billion-dollars-in-restoring-great-barrier-reef>; Acesso em: 24 fev 2019.

Anomalias térmicas vem sendo cada vez mais intensas (em termos de duração e temperatura alcançada) e frequentes, o que já levou a perda de até 50% de corais na Grande Barreiras de Corais (GBR) na Austrália (HOEGH-GULDBERG et al., 2019). Os relatórios de mudanças climáticas do *Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC estimou um aumento de $1^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ na temperatura global devidos às atividades humanas e prediz que o

aquecimento atinja 1,5 °C entre 2030-2050 caso as emissões continuem a aumentar no ritmo atual (relatório IPCC especial 1,5 °C, 2019). Mesmo diante do atual cenário de um aumento de 1°C na temperatura global, significa dizer que esses ecossistemas estariam expostos a temperaturas médias próximas de seu limiar de branqueamento e/ou mortalidade. Dessa forma, os ecossistemas recifais podem passar por um declínio catastrófico, havendo uma reestruturação global na composição da paisagem recifal.

O aumento de mortalidade de corais ao redor do mundo vem sendo cada vez mais reportados. Mesmo recifes, como no Brasil, considerados refúgios das mudanças climáticas (BANHA et al, 2019; TEIXEIRA et al, 2019), mostrou uma alta taxa de mortalidade de corais durante o último GBE em 2019 (DUARTE e VILLELA et al, 2020). Esse evento se torna particularmente preocupante devido à alta taxa de endemismo no Brasil.

O branqueamento de corais pode ser desencadeado por diversos motivos, como doenças causadas por patógenos (BEN-HAIM; ROSENBERG, 2002), baixa salinidade (GOREAU; MACFARLANE, 1990), exposição a compostos químicos (CERVINO et al., 2003), entre outros. No entanto, o aumento de temperatura é o principal fator que vem levando ao branqueamento de corais (HUGHES et al, 2018).

1.5. Papel dos microrganismos no holobionte coral

Além da importante e bem documentada relação simbiótica com as algas pertencentes à família Symbiodiniacea, os corais também abrigam uma vasta comunidade microbiana composta por representantes de bactérias, arqueias, protozoários, fungos e vírus (ROSENBERG et al., 2007; LITTMAN; WILLIS; BOURNE, 2011; WOOD-CHARLSON et al., 2015). O hospedeiro coral possui compartimentos bem definidos, e por isso, as camadas de muco, tecido e esqueleto apresentam comunidades microbianas distintas, formando microhábitats (BOURNE; MUNN, 2005; KOREN; ROSENBERG, 2006). A comunidade microbiana também se difere da encontrada na água circundante, não só em relação a composição (RIES et al., 2009), mas também em relação à concentração de células (ROSENBERG et al., 2007). Os microrganismos, mais

especificamente os procaríotos, desempenham funções fundamentais para a saúde e manutenção do coral hospedeiro, tais como fixação de nitrogênio, ciclagem de enxofre, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de antimicrobianos contra patógenos (figura 5) (PEIXOTO et al., 2017; VAN OPPEN e BLACKALL, 2019). A transferência horizontal de genes entre bactérias parece ser um facilitador evolutivo rápido, alterando funções metabólicas que podem posteriormente conferir características ao coral hospedeiro (WEBSTER e REUSCH, 2017). Essa relação íntima e de interdependência entre o coral hospedeiro e seus simbiosites é definida como holobionte, onde todos os organismos funcionam e evoluem como um único ser (ROHWER et al., 2002).

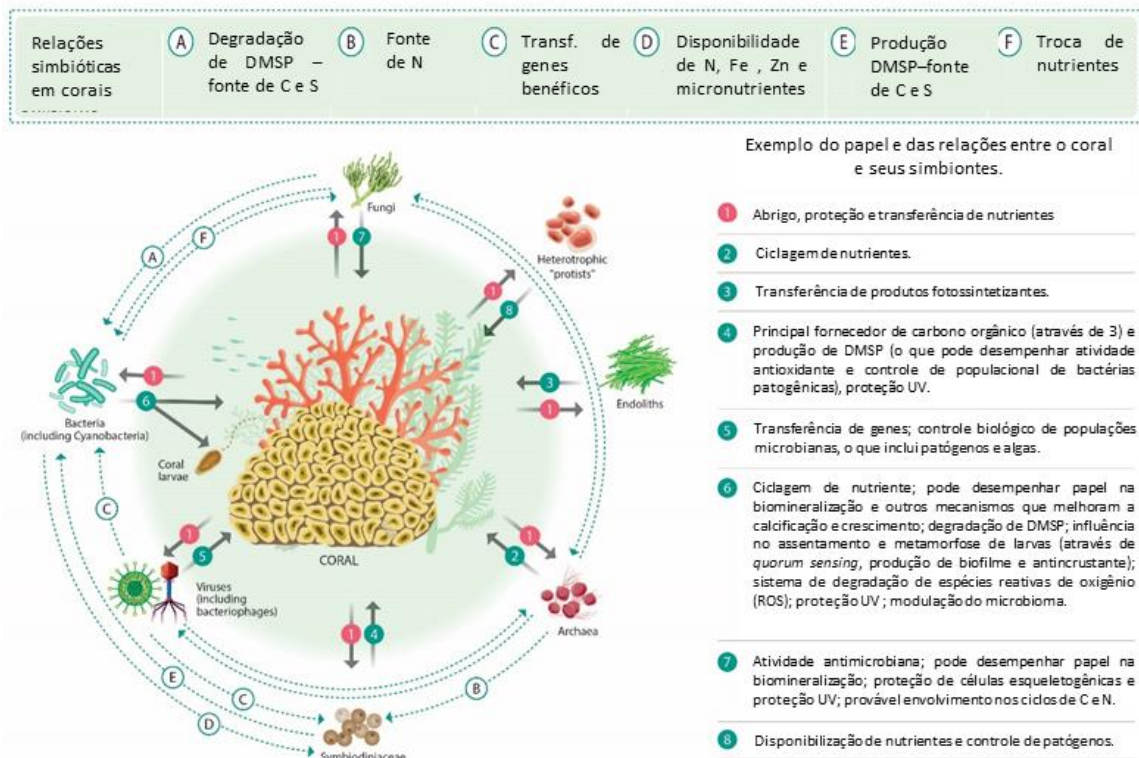


Figura 5: Possíveis associações entre corais e seus simbiosites e entre os simbiosites de corais (Adaptado de Peixoto et al., 2017).

1.6. Resistência contra estresse térmico em corais e os possíveis fatores determinantes

Os recifes de coral têm enfrentado eventos de branqueamento em massa sem precedentes nas últimas décadas, conduzido, principalmente, pelo aquecimento dos oceanos (como mencionado no item 1.4). No entanto, maiores

taxas de resistência ao branqueamento vêm sendo relatadas em recifes presentes em áreas onde a SST é, naturalmente, mais alta (RITSON-WILLIAMS E GATES, 2020, JURY E TOONEN, 2019, BELLANTUONO, 2012). Este fato sugere uma capacidade de aclimação e adaptação ao estresse térmico de corais presentes nestes locais. Ainda não há um consenso com relação as causas que levam à ascensão de corais resistentes ao branqueamento. No entanto, alguns fatores como o genótipo do coral, associação com algas mais resistentes e associação com grupos bacterianos específicos, vêm sendo considerados determinantes.

Nesse contexto, estudos demonstram que a pré-exposição a temperaturas elevadas mais brandas (temperatura “sub-letal”) conferem tolerância térmica aos corais expostos a estresse térmico subsequentes. A aclimação foi acompanhada de mudanças na expressão de genes do hospedeiro (AINSWORTH et al. 2016), alteração da densidade e fisiologia das algas endossimbióticas (BERKELMANS e VAN OPPEN 2006; MIDDLEBROOK et al. 2008; BELLANTUONO et al. 2012) ou ainda troca de populações de Symbiodiniaceae mais susceptíveis para espécies mais resistentes (PALUMBI et al., 2014; MORIKAWA e PALUMBI, 2019). Outros estudos de aclimação apontam ainda que o genótipo do coral é o principal fator que explica a aclimação (DRURY et al., 2017; DILWORTH et al., 2020). No entanto, mesmo corais adaptados a temperatura mais altas podem não sobreviver a eventos de anomalias térmicas mais extremas (AINSWORTH et al. 2016).

1.6.1. Resposta da comunidade microbiana ao estresse térmico

O holobionte é um sistema que funciona de maneira dinâmica, no qual mudanças ambientais geralmente estão associadas a alterações na comunidade microbiana. Tais alterações podem conduzir a um processo de quebra da homeostase, chamado de disbiose (EGAN e GARDINER, 2016), ou ainda à uma adaptação do holobionte às condições ambientais estabelecidas (ROSENBERG e FALKOVITZ, 2004; ZIEGLER et al., 2017). Alterações na comunidade microbiana podem ocorrer através de mecanismos como: i) mudanças na abundância de membros da comunidade microbiana (“shuffling”) e/ou ii)

mudanças de táxons através da aquisição de microrganismos do ambiente (WEBSTER; REUSCH, 2017). Dessa forma, a flexibilidade da comunidade microbiana frente às alterações ambientais consiste em uma maneira muito mais rápida e versátil de modular as respostas do hospedeiro do que a adaptação genética do coral, principalmente se tratando das taxas atuais de mudanças climáticas (WEBSTER; REUSCH, 2017; VOOLSTRA e ZIEGLER, 2020).

A importância da comunidade bacteriana na modulação da resiliência de corais vêm sendo cada vez mais reportada. O trabalho de Ziegler e colaboradores (2017), por exemplo, demonstrou que além do perfil térmico de onde os corais estão localizados, a dinâmica, composição e estabilidade da comunidade influenciam a susceptibilidade do coral ao branqueamento. Dessa forma, os autores observaram que 1) a comunidade bacteriana dos corais se alterou em resposta a um transplante de um local com perfil térmico mais ameno para um local com águas naturalmente mais quente; 2) Essa alteração se deu a ponto de os corais transplantados não demonstrarem diferenças na comunidade microbiana com colônias originalmente do local de transplante; 3) Além disso, tal alteração tornou os corais transplantados resistentes ao branqueamento em um experimento posterior de estresse térmico, em que a comunidade bacteriana não se alterou, ou seja, permaneceu estável. Em contraste, no mesmo trabalho, foi observado que os corais dos locais de onde as colônias transplantadas vieram originalmente, além de serem susceptíveis ao branqueamento não tiveram mudanças significativas no microbioma (ZIEGLER et al, 2017).

Estudos recentes apontam que a dinâmica/ flexibilidade da comunidade microbiana consistem num forte fator na modulação da resposta e aclimação do coral hospedeiro à estresses ambientais. O trabalho de Ziegler et al. (2019) sugere que a flexibilidade da comunidade microbiana pode ser modulada a partir de dois tipos de corais hospedeiros. Os “conformers”, que são espécies hospedeiras que mostram adaptação microbiana ao ambiente circundante; e os “regulators”, aquelas espécies hospedeiras que mantêm um microbioma estável, ou seja, exibem regulação microbiana independentemente das diferenças no ambiente externo. Baseados nesse estudo, Voolstra e Ziegler (2020) postularam a hipótese de que a flexibilidade do microbioma contribui para a capacidade dos organismos em responder e se adaptar às mudanças ambientais, que podem ocorrer de maneira mais rápida do que processos tradicionais de adaptação

genética dos organismos. Os experimentos citados anteriormente sugerem que a emergência de corais resilientes é fortemente influenciada pela tolerância térmica adquirida pela comunidade microbiana adaptada. Tais indícios convergem com a conhecida Hipótese do Coral Probiótico (RESHEF et al., 2006), a qual estabelece que mudanças na abundância relativa de membros benéficos pode se dar de forma a ajudar o holobionte na adaptação a condições de estresse. Portanto, a estratégia de introdução ou o aumento na abundância relativa, ou seja, a manipulação intencional de membros do microbioma de corais que sejam benéficos à saúde do holobionte, se mostra bastante promissora na área da conservação dos recifes. Tal conceito foi discutido por Peixoto e colaboradores (2017) e o termo *Beneficial Microorganisms for Corals (BMCs)* foi cunhado para se referir a esses microrganismos benéficos à corais. Os autores sugerem, ainda, que é possível manipular esses BMCs de forma a aumentar a resistência e resiliência do holobionte coral a diferentes tipos de estresse.

1.7. Manipulação do microbioma de corais como ferramenta para a conservação de recifes

O cenário das mudanças climáticas estimados para as próximas décadas reforçam o uso de técnicas de intervenções mais ativas para mitigar os efeitos do estresse térmico (PEIXOTO, SWEET E BOURNE, 2019). Nesse contexto, a Academia Nacional de Ciências, Engenharia e Medicina dos Estados Unidos (2018) sugeriu uma série de estratégias de intervenções para proteção, preservação e recuperação de ambientes coralíneos, incluindo a manipulação de probióticos em ecossistemas marinhos sugerido por Peixoto e colaboradores (2017).

A utilização de probióticos já é conhecida em outras áreas, tais como a utilização de bactérias promotoras de crescimento (PGPRs) (RUDOLPH; LABUSCHAGNE; AVELING, 2015) e probióticos para humanos (GILL; PRASAD, 2008). Mesmo na área ambiental, o termo “evolução assistida” chegou a ascender. Porém, até o dado momento, este termo era limitado à manipulação de espécies de Symbiodiniaceae e seleção transgeracional de corais mais resistentes (VAN OPPEN et al., 2015). No entanto, o grupo de Peixoto, antes mesmo de sugerir o termo “probióticos para corais” e “microrganismos benéficos

para corais” já havia conseguido manipular com sucesso o microbioma de corais em águas contaminadas com petróleo (SANTOS et al., 2015). A partir de tais indícios, juntamente com a hipótese do coral probiótico (explicada no item 1.6.1), além de indícios que o microbioma é um dos principais fatores responsáveis pela resiliência em corais, Peixoto e colaboradores (2017) sugeriu o termo *Beneficial Microorganisms for Corals*. Esse trabalho sugere diversas funções benéficas desempenhadas por microrganismos naturalmente associados com o coral, tais como a fixação de nitrogênio, a degradação de DMSP, produção de compostos protetores de UV, produção de moléculas de quórum sense, degradação de ROS, entre outras (figura 5). Adicionalmente, Peixoto et al. (2017) sugere a utilização de estirpes nativas, ou seja, isoladas do próprio coral e/ou local de onde esses organismos estão localizados, de forma a não comprometer a microbiota local. Dessa forma, além de fomentar um tratamento customizado para cada população, essa abordagem respeita particularidades genóticas e funcionais do ambiente a ser tratado. A manipulação de BMC se mostra uma estratégia biotecnológica não invasiva e com potencial na proteção e recuperação dos recifes de corais frente aos efeitos das mudanças climáticas. Tal hipótese foi testada e seu conceito corroborado, como demonstrado por Rosado et al. (2019). Neste experimento, a manipulação de BMC culminou na redução dos impactos da presença do patógeno *Vibrio coralliilyticus* (um conhecido patógeno de coral) e do estresse térmico no coral *Pocillopora damicornis*, onde apenas corais tratados com BMC não branquearam. No entanto, processos metabólicos e genéticos associados à essa manipulação/eficiência, assim como a capacidade em prevenir a mortalidade do coral, não foram elucidadas pelos autores.

2. Justificativa

O melhor entendimento acerca dos mecanismos envolvidos em processos de resiliência em corais e o desenvolvimento de alternativas para a proteção e conservação dos ambientes coralíneos é de extrema importância para se evitar o declínio de recifes de coral e, conseqüentemente, a extinção de diversas espécies de animais e seus metabólitos de interesse ao consumo humano.

O aquecimento das águas superficiais dos oceanos devido ao aumento da temperatura global vem causando branqueamentos e mortalidade em massa (HUGHES et al, 2018). No entanto, colônias afetadas e não afetadas do coral *Mussismilia hispida* foram identificadas e marcadas em Maraú, Bahia, Brasil. O surgimento de colônias resistentes de corais de uma mesma espécie pode estar associado a diferenças no microbioma desses indivíduos. Alterações no microbioma consiste numa maneira mais rápida e versátil de adaptação às mudanças ambientais do que adaptações genéticas do coral que dependem de tempo de geração mais longos do que dos microrganismos (WEBSTER; REUSCH, 2017). Dessa forma, a investigação da porção microbiana do holobionte coral é de extrema importância para uma compreensão mais global dos fatores que contribuem na sua resiliência.

Eventos de anomalia térmica vêm sendo mais constantes, aumentando também em intensidade e duração. Processos que levam ao surgimento natural de colônias resistentes não se dá em escala temporal e espacial que acompanhem as crescentes ocorrências de anomalias térmicas (AINSWORTH et al., 2016). Dessa forma, a elaboração de intervenções para mitigar os efeitos das mudanças climáticas é de extrema importância. O presente trabalho, além de investigar os processos e os grupos taxonômicos microbianos envolvidos na resiliência de corais frente ao estresse térmico, também desenvolveu uma estratégia biotecnológica para a diminuição da mortalidade de corais durante o branqueamento. A eficiência da utilização de microrganismos benéficos para corais já foi demonstrada em estudo anterior (ROSADO et al., 2019), porém os mecanismos envolvidos na resistência térmica com a manipulação do microbioma não foram elucidados. Dessa forma, os dados obtidos nesse trabalho visam elucidar não apenas lacunas de conhecimento ainda não

preenchidas na área, como também comprovar a eficiência da utilização de Microrganismos Benéficos para Corais (BMC) na conservação de recifes de diferentes partes do mundo.

3. Objetivos

3.1. Objetivos geral

O objetivo geral desse trabalho é compreender o papel da microbiota na resistência térmica de corais brasileiros, além de desenvolver uma estratégia para aumentar a resiliência de corais branqueados devido ao estresse térmico.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Capítulo I - OPENING THE HEAT BOX: MULTI DOMAIN ANALYSIS REVEALS DIFFERENT FUNCTIONAL AND MICROBIAL ASSOCIATION WITH THERMAL RESISTANT AND SENSITIVE CORALS

- Investigar a tolerância térmica de corais com diferente susceptibilidade ao branqueamento em sistema experimental de mesocosmo;
- Comparar a dinâmica da comunidade bacteriana associada a corais Termo resistentes e Termo sensíveis;
- Estimar táxons bacterianos que sejam indicadores de termo tolerância;
- Avaliar o papel funcional dos múltiplos componentes do holobionte associados com a termo resistência.

3.2.2. Capítulo II - CORAL MICROBIOME MANIPULATION ELICITS METABOLIC AND GENETIC RESTRUCTURING TO MITIGATE HEAT STRESS AND EVADE MORTALITY.

- Isolar e selecionar microrganismos benéficos para corais, além construir um consórcio com ação probiótica (BMC) para aumentar a resiliência de corais sob estresse térmico;
- Avaliar em sistema experimental de mesocosmo alterações fisiológicas e morfológicas de corais tratados com Placebo e BMC sob estresse térmico;
- Avaliar a eficácia do consórcio BMC em manipular o microbioma de corais adultos sob estresse térmico;
- Avaliar o perfil metabólico de corais tratados com Placebo e BMC sob estresse térmico;

- Avaliar alterações funcionais de corais tratados com Placebo e BMC sob estresse térmico.

4. Materiais e Métodos

4.1. Declaração ética e consentimento para participação

A permissão para a amostragem foi obtida através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A permissão para pesquisa microbiana foi obtida através do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) – número de permissão: A620FE5.

4.2. Caracterização de colônias termo resistentes e termo sensíveis e amostragem

Durante o evento de branqueamento em massa de 2015/2016, colônias do coral *Mussismilia hispida* afetadas e não afetadas pelo branqueamento foram identificadas em uma lagoa de recife semi-fechada, localizada na praia de Taipú de Fora, no município de Maraú, Bahia, Brazil (13°56'10.97"S; 38°55'38.71"O). As colônias de *M. hispida* estavam localizadas na mesma profundidade (1,5 m) e sob a mesma irradiância ($350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 100$ - medido usando um fluorímetro subaquático de pulso e amplitude modulada (Diving-PAM, Walz, Effeltrich, Alemanha). Para definir a resistência (não afetadas) ou sensibilidade (afetadas) desses corais, as colônias foram envolvidas com papel alumínio para evitar a dissipação não fotoquímica dos centros de reações do fotossistema II e tiveram o rendimento quântico máximo do Fotossistema II (F_v/F_m) das algas associadas medido utilizando o aparelho Diving-PAM. Colônias não branqueadas que apresentaram valores de F_v/F_m acima de 600 unidades foram marcadas como Termo Resistentes (TR), enquanto colônias branqueadas e com valores de F_v/F_m menor que 300 foram marcadas como Termo Sensíveis (TS). Fragmentos de corais TR e TS foram coletados durante o evento de branqueamento em 3 de julho de 2016 (amostras F1), e após período recuperação das colônias sensíveis (valores de F_v/F_m atingindo acima de 600) em 24 de agosto de 2016 (amostras F2). Essas amostras foram armazenadas em criotubos e transportadas em nitrogênio líquido até o Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) para posteriores análises. Além disso, durante a segunda coleta, colônias vivas de TR e TS foram coletadas e transportadas até o Centro para Estudos de Biorremediação de Óleo em Ambientes Marinhos CENPES/UFRJ - município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, onde os experimentos foram realizados. As colônias foram transportadas em caminhão refrigerado a 24 °C em sacos plástico duplos contendo 2/3 de água do mar. A água dos sacos contendo as colônias foi renovada em pelo menos 50% diariamente até a chegada no centro de pesquisas. Ao chegar no centro de

pesquisas, as colônias foram transferidas para tanques de 1.500 L com circulação constante de água do mar e ar por um período de aclimação preliminar de 7 dias a 26 °C, a fim de monitorar possíveis danos causados pelo transporte. Posteriormente foi realizada a fragmentação das colônias em fragmentos de entre 5 – 15 cm que continham pelo menos 3 pólipos. Os fragmentos foram, então, transferidos para os tanques experimentais para aclimação, onde permaneceram sob as mesmas condições até o início do experimento.

4.3. Rodada experimental

4.3.1. Estrutura do mesocosmo

O mesocosmo utilizado nos experimentos do capítulo I consiste em dois banhos-maria retangulares (190 cm x 50 cm x 10 cm), onde um total de 8 aquários (4 repetições por tratamento) com capacidade de 1,3 L cada (15 cm x 11 cm x 12 cm) (figura 6) foram alocados.

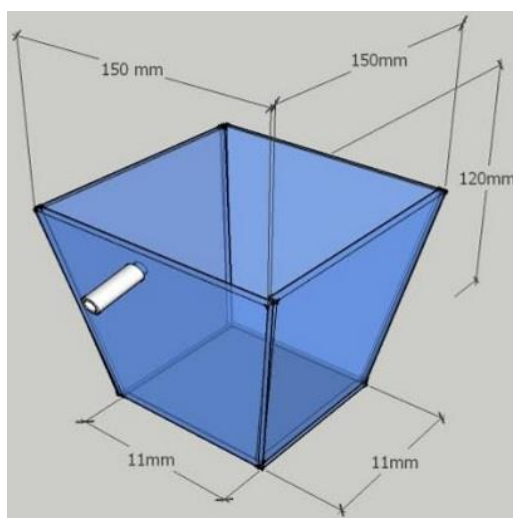


Figura 6: Representação em 3D do aquário utilizado no experimento gerada com auxílio do programa SketchUp 2015.

Os aquários foram abastecidos com água do mar capturada na costa próxima ao local onde os experimentos foram realizados. O sistema de mesocosmo foi desenvolvido a fim de produzir réplicas biológicas verdadeiras, e, por isso, cada aquário possuía reservatório, circulação de ar e água independentes. Cada sistema individual foi abastecido com 10 L de água do mar, e a circulação de água entre o reservatório e o aquário era feita por uma bomba

Mini A (Sarlo Better, São Caetano do Sul, Brasil), compreendendo uma vazão de 250 mL min^{-1} , e proporcionando circulação de dez vezes do volume do aquário por hora. A cada dois dias 10% da água dos reservatórios era renovada. A circulação de ar foi realizada através de bombas HG-370 (Sun Sun) conectadas a mangueiras de silicone e controladores de fluxo. Para manter a temperatura dos banhos-maria homogênea, a circulação da água desses era realizada por duas bombas SB 1000A (Sarlo Better). Um aparelho Full Gauge controls MT-518ri (Canoas, Brasil) era responsável por medir e acionar os sistemas de resfriamento ou aquecedores conforme necessários. Para o resfriamento do sistema, os banhos-maria estavam conectados a um tanque de 1000 L contendo água a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O sistema de aquecimento consistiu em dois aquecedores de 100 W (Atman, China) mergulhados diretamente em cada banho-maria e acoplados ao Full Gauge. A salinidade era medida a cada dois dias e, quando necessário, ajustada para 35 ppm com água destilada. Em ambos os experimentos os corais receberam luz natural do sol, seguindo ciclos dia / noite (12h / 12h). A luz solar foi bloqueada em 70%, o que foi realizado através de sombrites para reproduzir uma incidência luminosa entre $250 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ao meio-dia. Nesse sistema cada aquário representava uma réplica biológica de cada tratamento ($n = 4$), onde um dos fragmentos foi escolhido aleatoriamente como unidade de amostragem para cada tempo de amostragem.

A figura 7 mostra uma foto da estrutura do mesocosmo utilizado nos experimentos do capítulo I.



Figura 7: Estrutura final do mesocosmo. (A) um dos banhos-maria onde os aquários de um dos tratamentos foram alocados, (B) reservatórios contendo 10L água do mar que abastecem os aquários e (C) sistema de circulação de ar conectado às mangueiras de silicone que distribuem individualmente o ar para cada aquário.

4.3.2. Desenho experimental

Corais Termo Resistentes (TR) e Termo Sensíveis (TS) foram utilizados em dois experimentos com o intuito de avaliar a dinâmica das comunidades microbianas associadas aos diferentes tipos de corais frente ao estresse térmico. Para isso, corais TR foram submetidos a uma onda de calor simulada, aquecendo gradualmente de 26 °C a 30,5 °C, quando a temperatura foi mantida por 10 dias, seguido por 4 dias a 32 °C. Já os corais previamente identificados como TS foram submetidos a uma onda de calor menos intensa, aquecendo gradualmente de 26° C a 29,5 °C, quando a temperatura foi mantida por 10 dias,

seguido por 4 dias a 30,5 °C. As diferentes temperaturas de pico foram baseadas em experimentos piloto anteriores, onde os corais sensíveis morreram a 32 °C, enquanto os resistentes não apresentaram sinais de estresse a 30,5° C nem a 32 °C. Em ambos os experimentos a primeira amostragem (T0) foi realizada após os 10 dias de aclimação a 26 °C. Em seguida, a temperatura foi gradualmente aumentada em 0,5 °C por dia até atingir a “temperatura pré-pico” (30,5 °C para TR e 29,5 °C para TS). Após 10 dias nessas condições a temperatura foi novamente aumentada (0,5 °C por dia) até 32 °C, para corais TR, e 30,5 °C, para corais TS. Após 4 dias nessas condições o segundo tempo de amostragem (T1) foi realizado seguido pela diminuição gradual da temperatura para 26° C (0,5 °C por dia). O último tempo de amostragem (T2) foi realizado após 15 dias de recuperação a 26° C. Um esquema do perfil de temperatura seguido em ambos os experimentos é mostrado na figura 8.

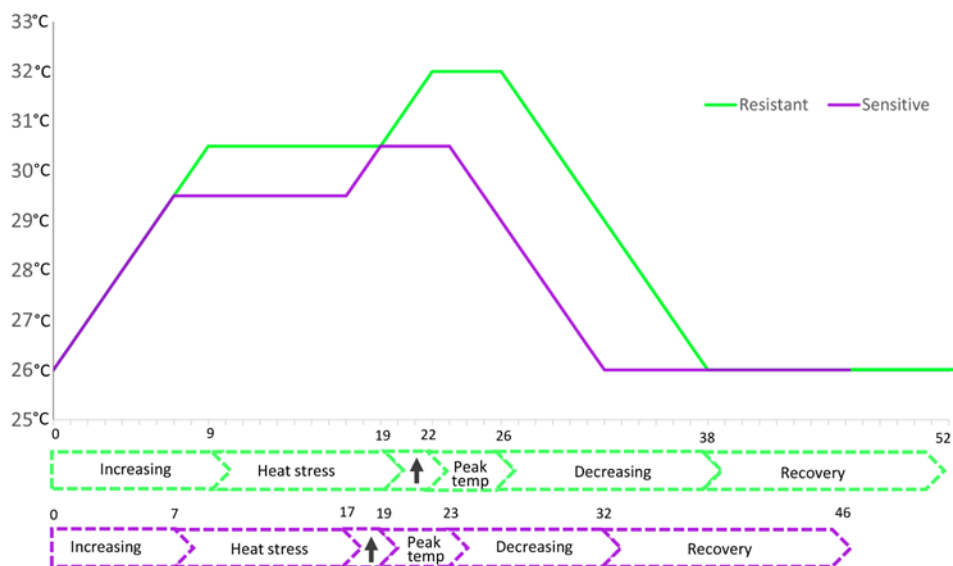


Figura 8: Gráfico do perfil de temperatura seguido nos experimentos com corais TR e TS.

4.4. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água

Parâmetros físico-químicos como pH, concentração de oxigênio dissolvido (OD) e salinidade da água também foram monitorados durante o decorrer do experimento usando uma sonda multiparamétrica (Modelo HI 9.828, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo). A salinidade da água dos aquários era medida e, quando necessário, ajustada com água destilada para 35 ppm (± 1) a

cada dois dias. Já parâmetros como pH e OD foram medidos durante os pontos de amostragem.

4.5. Avaliação dos parâmetros de saúde do coral

4.5.1. Avaliação morfológica

A avaliação morfológica dos fragmentos de corais foi realizada com auxílio do cartão de referência colorimétrica *Coral Health Chart* desenvolvido pela ONG Coral Watch (University of Queensland). *Coral Health Chart* consiste em um gráfico com diferentes padrões de cores de corais saudáveis e, para cada padrão, uma série de variação de intensidade que representam diferentes estágios de branqueamento. De acordo com o cartão, a coloração do coral é classificada numa escala de 6 unidades, onde 6 consiste na coloração mais forte e 1 sem coloração, ou seja, completamente branqueado (figura 9). Corais que diminuíram duas ou mais unidades de coloração entre T0 e outros pontos de amostragem foram considerados branqueados (HORVATH et al., 2016). Cada réplica amostrada foi fotografada nos tempos de amostragem com câmera digital Canon T3i.

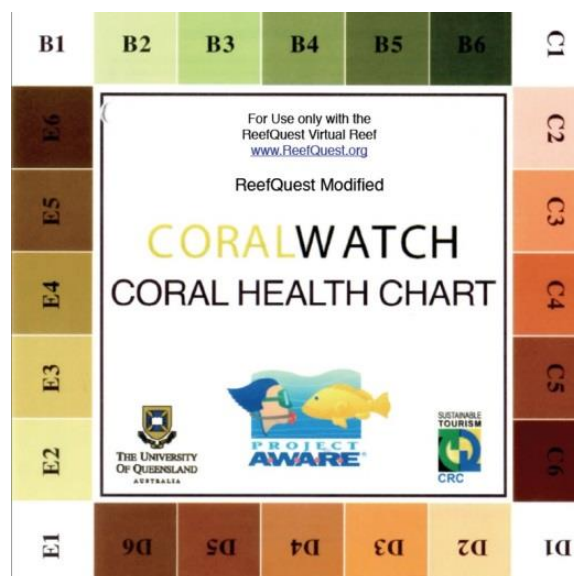


Figura 9: Cartão colorimétrico "Coral Health Chart" utilizado nas avaliações morfológicas do coral.

4.5.1.1. Quantificação da eficiência fotossintética das algas endossimbióticas

A eficiência fotossintética das algas endossimbióticas foi avaliada por fluorometria de pulso e amplitude modulada (PAM). Para isso, foi utilizado um sistema submersível de PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha) equipado com um diodo emissor vermelho (LED, pico a 650 nm). Para evitar processos não fotoquímicos de dissipação da energia de excitação do Fotossistema II, foram realizadas medições após o pôr do sol, com pelo menos 30 minutos de escuridão para garantir a dissipação fotoquímica completa dos centros de reação. O rendimento quântico máximo do Fotossistema II das algas endossimbióticas é determinado como F_v/F_m . Essa medida é utilizada como parâmetro indireto da saúde do holobionte coral, pois é capaz de mensurar a eficiência fotossintética das algas simbióticas, e, portanto, um indicativo do branqueamento (SCHREIBER, 2005). O aparelho foi configurado da seguinte forma: Measuring Light Intensity (MI) = 5; Saturation Pulse Intensity (SI) = 8; Saturation Pulse Width (SW) = 0,8, Gain (G) = 2; e Damping (D) = 2. Ao longo do experimento, o mesmo fragmento de coral de cada aquário foi usado para medir o F_v/F_m . As médias e o desvio padrão do valor de F_v/F_m de cada tratamento foram usados para avaliar diferenças estatísticas entre os tempos de coleta. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa PAST3, e devido os resultados apresentarem uma distribuição não-normal, o teste não paramétrico de Mann Whitney pareado foi utilizado, seguido do teste de Kruskal Wallis, para comparar a análise de médias (POTVIN e ROFF, 1993).

4.6. Extração e sequenciamento do gene 16S RNAr

Amostras de *M. hispida* coletadas em cada tempo de amostragem foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento. Os fragmentos de corais foram descongelados e depois triturados com auxílio de pilão e cadinho estéreis, utilizando nitrogênio líquido para a preservação do material genético a ser extraído. O total de 0,5 g do triturado (muco, tecido e esqueleto) de cada amostra foi utilizado para extração de DNA com o auxílio do Kit PowerBiofilm® DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.) (WEBER; DEFORCE; APPRILL, 2017). Posteriormente, a concentração de DNA foi determinada usando o fluorímetro Qubit® 2.0 e o kit High Sensitivity DNA Kit (Invitrogen, USA).

A região variável V4 do gene 16S rRNA derivado das amostras de coral foi amplificada usando os iniciadores 515F / 806R e o sequenciamento de extremidade pareada (2 × 250 pb) foi realizado seguindo as seguintes condições: 94 °C durante 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 40 segundos e 72 °C durante 1 minuto, e por fim uma extensão a 72 °C por 5 minutos (CAPORASO et al., 2011). O sequenciamento foi realizado pela empresa Argonne National Laboratory (Lemont, IL, EUA), usando o kit Next Generation Sequencing Core na plataforma Illumina Miseq.

4.7. Análise da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene 16S RNAr

Os arquivos de sequenciamento foram processados utilizando o programa Mothur versão 1.42.1., onde, primeiramente, foram demultiplexados, gerando sequências brutas pareadas para cada amostras. As sequências brutas foram usadas para montagem de contigs utilizando o comando “make contig” com o parâmetro “bdiffs=1”. Posteriormente, sequências maiores que 290 pb e menores que 220 pb foram excluídas, utilizando o comando “screen.seqs” com os parâmetros “maxambig=0”, “maxlength=290”, “minlength=220”. O banco de dados Silva (utilizando apenas sequências amplificadas com o mesmo iniciador utilizado para nossas amostras) foi usado como referência para o alinhamento das sequências. Sequências com baixo alinhamento foram removidas utilizando os comandos “screen.seqs” e “filter.seqs”. As sequências foram agrupadas utilizando o comando “pre.cluster” e o parâmetros “diffs=2”. Quimeras foram detectadas através do comando “chimera.vsearch” e, então, eliminadas. O banco de dados Greengenes (versão de Agosto de 2013 - utilizando apenas sequências amplificadas com o mesmo iniciador utilizados para nossas amostras) foi empregado para classificar as sequências, utilizando o comando “classify.seqs” e bootstrap com corte de 80. Sequências classificadas como cloroplastos, Eucariotos, Arqueias e aquelas não alinhadas em nenhum domínio foram removidas.

Como forma de controle de qualidade, uma amostra branca foi também sequenciada, ou seja, foi seguido o mesmo protocolo de extração de DNA sem adição de amostra biológica. Todas as sequências presentes na amostra branca foram filtradas e removidas das amostras experimentais. As sequências

resultantes foram usadas como input para o comando “dist.seqs”. As sequencias foram agrupadas em grupos taxonômicos operacionais (OTUs), com um corte de 3% de dissimilaridade. Todos os singletos foram removidos e para evitar viés de amostragem, as amostras foram normalizadas randomicamente para o mesmo número de sequencias (8.421 para o experimento de campo, 5.059 para experimento com corais sensíveis e 3.954 para experimento com corais resistentes). O sumário taxonômico, gerado a partir das etapas detalhadas anteriormente, foi utilizado para entender a composição bacteriana de cada amostra. A distribuição das OTUs foi usada para calcular índices de diversidade (Shannon, Fishers’ dominance and Chao) e para estabelecer um padrão de relação entre as amostras, além de avaliar diferenças específicas entre as OTUs.

As análises estatísticas e gráficos foram gerados através do programa PAST3. Escala multidimensional não métrica (NMDS) foi gerado utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis com a matriz de distribuição de OTU como input. A temperatura, dias de experimento e o valor de F_v/F_m foram usados como coeficiente de correlação entre cada variável e os vetores de ordenação do NMDS para estabelecer a relação entre os dados ambientais da comunidade bacteriana. Índices de Shannon e Fisher’s dominance foram testados para diferenças estatísticas, utilizando análise de variância de duas vias (ANOVA) e o teste Tukey post-hoc.

Táxons indicadores de estresse térmico (tempo de amostragem) e o da susceptibilidade do coral (resistente ou sensível) foram indicados através da Análise de Espécies Indicadoras (ISA – do inglês *Indicator Species Analyses*) utilizando o programa PC-ORD 6.0. Para avaliar os táxons indicadores de estresse térmico, foram utilizados dados de ambos os corais e a susceptibilidade foi desconsiderado. Já para avaliar os táxons indicadores à susceptibilidade ou resistência, o tempo de amostragem foi desconsiderado. Todas as OTUs com $p < 0,05$ (com base na técnica de Monte Carlo) e Valor do Indicador (IV) maior que 60 foram selecionadas como indicadoras. O menor nível taxonômico foi utilizado para classificar as OTUs nesse caso.

4.8. Metagenoma

4.8.1. Extração e sequenciamento de DNA metagenômico

O efeito do estresse térmico nas características funcionais, bem como nas correlações de múltiplos domínios em corais TR e TS, foi analisado por metagenômica. As amostras do início do experimento (T0 - 26 °C) e do pico de temperatura (T1 - 32 °C para resistente e 30,5 °C para sensível) foram sequenciadas conforme descrito abaixo. Um pool de três extrações de DNA de cada réplica biológica foi usado para aumentar a concentração de DNA das amostras. A qualidade do DNA extraído assim como a concentração foi avaliada em Nanodrop e pelo Fluorometer Qubit® utilizando o kit 2.0 High Sensitivity DNA (Invitrogen, EUA), respectivamente. O sequenciamento shotgun de uma via foi realizado no Laboratório Nacional de Argonne (Lemont, IL, EUA) usando o Next Generation Sequencing Core em uma plataforma Illumina HiSeq 2500.

4.8.2. Processamento de dados de metagenômica

A análise do metagenoma consistiu em duas partes: recuperação de genomas (bins) e análise dos efeitos da mudança de temperatura nas funções das comunidades microbianas. A recuperação de genomas de procariotos, eucariotos e vírus foi realizada empregando abordagens e ferramentas específicas que tratam de cada tipo de microrganismo. A análise dos efeitos do estresse térmico nas funções das comunidades microbianas de origem procariótica, eucariótica e viral foi determinada pela identificação de quadros de leitura aberta (ORFs – do inglês *open read frame*) estatisticamente significativos entre as amostras de coral em temperaturas normais (26 °C) e altas (30,5 °C para corais termos sensíveis e 32 °C para termo resistentes).

Para isso, as leituras brutas obtidas do sequenciamento shotgun foram filtradas pela qualidade usando Trimmomatic (versão 0.36 <https://github.com/timflutre/trimmomatic>), onde os parâmetros TRAILING foi definido como 3, MINLEN definido como 60, HEADCROP definido como 10 e todos os outros foram mantidos com os valores padrão. A montagem de sequências de qualidade controlada foi realizada usando duas metodologias diferentes de acordo com o grupo microbiano alvo. A identificação das ORFs e a recuperação dos genomas virais foram baseadas nos contigs gerados a partir

da montagem obtida pelo MEGAHIT (versão 1.1.3). A recuperação do genoma procariótico e eucariótico foi baseada nos scaffolds montados gerados pelo IDBA-UD (<https://github.com/loneknightpy/idba>) usando parâmetros padrão. A escolha de metodologia de montagem diferentes para vírus é devido ao melhor desempenho do programa MEGAHIT quando comparado ao IDBA-UD na recuperação de sequências virais.

4.8.3. Recuperação de bins

Após a montagem de scaffolds procarióticos e eucarióticos, assim como contigs virais, a recuperação de genomas ou potenciais genomas (chamados de bins) foi realizada por meio da ferramenta DAS (SIEBER, 2017), utilizando parâmetros indicados pelos desenvolvedores. Os métodos de binning usados nesta abordagem compreendem ABAWACA (<https://github.com/CK7/abawaca>), CONCOCT (ALNEBERG et al., 2014), MaxBin2 (WU et al., 2015) e MetaBAT (KANG et al., 2015). A avaliação da qualidade, incluindo completude e estimativa de contaminação dos bins gerados foi realizada com CheckM (função “lineage_wf”) (PARKS et al., 2017). Um bin procariótico foi definido como tal de acordo com a definição proposta por Parks (PARKS et al., 2017). Bins eucarióticas foram recuperadas usando o pipeline EukRep de acordo com as instruções do desenvolvedor (WEST et al., 2018). Resumidamente, esta pipeline separa os scaffolds montados com IDBA-UD em eucarióticos ou procarióticos, empregando um algoritmo de *machine learning* treinado com genomas baixados do NCBI e JGI. Em seguida, os scaffolds eucarióticos foram armazenados usando CONCOCT. Bins com tamanho menor que 2,5 Mbp foram removidos. A avaliação da qualidade de bins eucarióticos foi determinada usando BUSCO (WATERHOUSE et al., 2017) de acordo com as instruções dos desenvolvedores. A atribuição taxonômica dos bins gerados foi realizada por taxator-tk (DRÖGE et al., 2014).

Os contigs virais recuperados foram identificados como categorias VirSorter 1 e 2, bem como os contigs com um valor de p VirFinder $<0,01$ foram mantidos para análise posterior. Esses contigs virais significativos foram então agrupados por conjunto de dados em 95% de identidade de nucleotídeo (nt) usando VSEARCH para remover redundância. Contigs <1.000 nt foram removidos. Para atribuição taxonômica, as sequências de aminoácidos das

ORFs virais foram alinhadas a um banco de dados de proteína RefSeq viral (fevereiro de 2019) usando DELTA-BLAST (BORATYN et al., 2012) com um valor de e-limite de 10^{-3} . Se mais de uma ORF por contig estava presente após o alinhamento, escolhemos a ORF representativa mostrando o menor valor e e a maior pontuação de bits. As atribuições de taxonomia viral foram calculadas para todas as ORFs representativas.

ORFs montadas utilizando MEGAHIT foram mapeadas para cada bin gerado (incluindo todos os domínios taxonômicos) utilizando Bowtie2 (LANGMEAD et al, 2012). Finalmente, o número de ORFs que foram mapeados para cada bin e genoma do hospedeiro foi calculado usando SAMtools (LI et al., 2009).

4.8.4. Identificação funcional de ORFs e análise estatística

A análise dos efeitos do estresse térmico nas funções das comunidades microbianas, incluindo procariotos, eucariotos e vírus, foi determinada pela identificação de ORFs que foram estatisticamente significativos entre as amostras. Consideramos estatisticamente significativos aqueles que mostram $p < 0,05$ entre grupos de amostras usando o método das médias dos mínimos quadrados (pacote lsmmeans 2016 – LENTH, 2016) com False Discovery Rate (FDR) para testes de correção múltipla (pacote R “lsmmeans”). As amostras foram agrupadas em TR ou TS (“T0 sensível” - amostras de coral sensíveis coletadas no início do experimento incubadas a 26 °C; “T1 sensível” - amostras de coral sensíveis coletadas após o pico de temperatura de 30,5 °C); “T0 resistente” - amostras de corais resistentes coletadas no início do experimento incubadas a 26 °C; e “T1 resistente” - amostras de corais resistentes coletadas após o pico de temperatura de 32 °C).

A anotação funcional das ORFs identificadas foi realizada pesquisando a seção Swissprot do banco de dados Uniprot (UniProt, 2015) usando BLAST v2.2.30. Para cada ORF prevista, a correspondência com o bitcore mais alto foi usada para a anotação putativa se ela tivesse um valor $e > 1e^{-5}$. Além disso, a anotação funcional das ORFs também foi realizada por GhostKOALA (KANEHISA, et al., 2016).

Além disso, a porcentagem de eucariotos e procariontes nas diferentes bibliotecas metagenômicas foi calculada. EukRep, um pipeline desenvolvido para a recuperação de bins eucarióticos (WEST et al. 2018) foi usado para separar os scaffolds em procarióticos e eucarióticos. VirSorter (ROUX, et al., 2015) e VirFinder (REN, et al., 2017) foram usados para determinar contigs virais. Além disso, a identificação de linhagens Symbiodiniaceae predominantes nos dados de metagenoma foi realizada identificando sequências SSU usando Emirge e atribuindo taxonomia a essas sequências usando o banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de/>). Para o gênero Symbiodiniaceae identificado, conjuntos de genomas gerados anteriormente foram baixados do banco de dados do NCBI. A proporção de eucariotos, procariotos e vírus em cada biblioteca foi determinada em duas etapas. Leituras verificadas de qualidade foram primeiro montadas com pandaseq (MASELLA, et al. 2012) e, em segundo lugar, mapeadas para os scaffolds correspondentes (eucariotos e procariontes) e contigs (vírus). O número de leituras mapeadas para eucariotos, procariontes (scaffolds) e vírus (contigs) foi calculado usando samtools. Os diagramas de Venn foram gerados usando um script R interno. O número de leituras mapeadas foi calculado com samtools e as porcentagens de leituras mapeadas como parte do total de leituras foram calculadas usando Libreoffice-calc. Além disso, determinamos se as ORFs estatisticamente significativas eram de origem mitocondrial. Assim, foram selecionados os contigs contendo ORFs estatisticamente significativas. Depois, esse pool de contigs foi mapeado contra o banco de dados de sequências mitocondriais do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/contam/>). Todos os alinhamentos com valor de $p < 0,001$ foram considerados significativos. Sequências alinhadas com mitocôndrias foram excluídas das análises.

Os heatmaps foram gerados com a função heatmap.2 (pacote gplots v3.0.1.1 R) usando a abundância relativa normalizada de ORFs. A normalização foi realizada usando a função de escala (base R) sem centralização.

4.9. Coleta de colônias de *Mussismilia hispida*

Colônias de *Mussismilia hispida* foram coletadas por mergulho autônomo nos recifes de Coroa Vermelha, município de Santa Cruz de Cabrália, Bahia, Brasil. Colônias foram coletadas em três locais ao longo do recife: local A (16° 20'57,99 "S; 038° 58'45,00" W), local B (16° 20'39,30 "S; 038° 58'38,10" W) e local C (16° 22'02,20 "S; 039° 0'15,63" W), em profundidades entre 1,5 e 15 m, entre os dias 26-29 de janeiro de 2017. As colônias foram transportadas em sacos plástico duplos contendo 2/3 de água do mar. Na chegada à estação de pesquisa, cerca de 12 horas após a amostragem, as colônias de corais foram transferidas para tanques de 1.500 L com circulação constante de água do mar e ar por um período de aclimação preliminar de 3 dias. Posteriormente, as colônias foram micro-fragmentadas em fragmentos de ~ 7 cm e colocadas no sistema experimental para aclimação e recuperação do tecido ao corte. Cerca de 4 dias após a micro-fragmentação, os fragmentos começaram a recuperar, mas foram mantidos em condições de aclimação (26 °C) até que todos os fragmentos atingissem taxas F_v/F_m próximas a 600.

4.10. Isolamento de bactérias de colônias termo resistentes do coral *Mussismilia hispida*

Fragmentos de três colônias termo resistentes (TR) do coral *Mussismilia hispida* previamente marcadas no estudo descrito no capítulo I, sessão 4.2, foram usados como uma fonte para isolar microrganismos benéficos para corais. Duas abordagens diferentes foram usadas para o isolamento bacteriano. Primeiro, 0,5 g do triturado composto pelos fragmentos das três colônias de coral foi ressuspense em 45 mL de solução salina estéril (0,85 % NaCl) e depois agitado por 16 h com pérolas de vidro estéreis. Após a incubação, triplicadas de sub amostras (100 µL) das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio ágar marinho (Marine Agar Zobell 2216, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), meio de ágar

marinho diluído (Meio de Agar Marinho 2x diluído com NaCl a 2,5% e ágar ajustado), meio de Luria-Bertani NaCl a 2,5% (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 25 g de NaCl e 15 g de ágar para 1000 mL de água destilada) ou Meio de água do mar (1000 mL de água do mar e 13 g de ágar). Além disso, fragmentos de ~ 0,5 mm foram colocados diretamente nesses meios de cultura. Todas as placas foram incubadas a 26 °C e o crescimento bacteriano acompanhado por 48h. Um total de 133 colônias bacterianas foram isoladas com base na morfologia, sendo 67 derivadas do triturado e 52 derivadas dos minis fragmentos. Cada colônia morfologicamente diferente foi armazenada em ultrafreezer em concentração final de 20% de glicerol e recuperada quando necessário para triagem funcional.

4.11. Triagem funcional de estirpes benéficas para corais

Cada isolado bacteriano morfologicamente diferente foi testado quanto as características benéficas para corais, conforme proposto por Peixoto et al. (2017), incluindo atividade de enzima sequestrante de espécies reativas de oxigênio, atividade antagonista contra patógenos de coral, presença de genes responsáveis pela ciclagem de nitrogênio e genes envolvidos na degradação de dimetilsulfoniopropionato (DMSP).

4.11.1. Produção de substâncias antimicrobianas

A atividade antagonista contra as cepas *Vibrio coralliilyticus* YB (DSM19607) (V1) e *Vibrio alginolyticus* (BAA450) (V2) foi testada pelo método de difusão em ágar (GIAMBIAGI-MARVAL et al., 1990). Ambas as estirpes foram consideradas patogênicas ou potenciais patógenos para corais, respectivamente, em estudos anteriores (BEN-HAIM et al., 2003; ALVES, 2010). Primeiramente, 20 µL do estoque em glicerol de cada isolado foi inoculado em frascos contendo meio LB 2,5% NaCl pelo o tempo necessário de turvamento do meio de cultura, indicando crescimento bacteriano. 20 µL dessa suspensão foi inoculada em forma de *spot* no meio de cultivo LB a 2,5% NaCl, colocando três pontos para cada isolado (representando 3 réplicas). As placas foram incubadas a 26 °C pelo tempo necessário para o crescimento do isolado de interesse.

Posteriormente, os isolados foram inativados através da volatilização de clorofórmio por 30 minutos, seguido pelo derramamento de 3 mL de meio LB semissólido 2,5% NaCl (ágar 0,7%) contendo os indicadores V1 ou V2 sobre os pontos inativados. Estas placas foram então incubadas a 28 °C durante 16 h, e a atividade antagonista foi indicada por halos de inibição em torno dos isolados testados ou não detecção de crescimento de *Vibrio* sobre a colônia do isolado testado. A figura 10 ilustra a metodologia descrita acima e usada para detecção de atividade antagonista contra patógenos de corais.

- **Produção de atividade antagonista contra patógenos de corais**

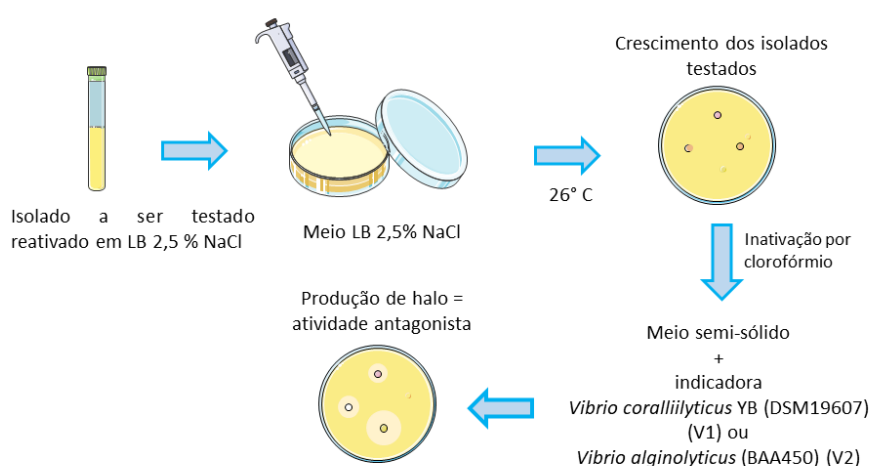


Figura 10: Esquema da metodologia utilizada para detecção de atividade antagonista contra patógenos de corais, utilizando o método de difusão em ágar.

4.11.2. Teste de detecção da atividade da enzima sequestrante de espécies reativas de oxigênio: Catalase.

Os isolados foram testados quanto à atividade de enzimas sequestrantes de espécies reativas de oxigênio, com base na produção qualitativa e qualitativa da catalase. Para isso, 50 µL de cultura líquida de cada isolado foi misturado com 50 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (v / v). O surgimento de bolhas após o esfregaço significa a formação e liberação de oxigênio molecular a partir de H₂O₂ pela reação da enzima catalase, sendo o isolado em questão considerado catalase positiva. A quantidade de espuma produzida também foi considerada.

4.11.3. Extração de DNA genômico de isolados bacterianos

Para dar continuidade as etapas descritas nos próximos itens, foi necessária a utilização do DNA genômico dos isolados bacterianos. Para isso, os isolados foram incubados em 5 mL de meio LB 2,5% NaCl e incubados sob agitação de 150 rpm a 26 °C. Após turvação do meio, a extração do DNA genômico foi realizada seguindo o protocolo do fabricante do kit comercial “Wizard Genomic DNA extraction Kit” (Promega).

4.11.4. Presença de genes relacionados à fixação de nitrogênio (*nifH*) desnitrificação (*nirK*) e degradação de DMSP (*dmdA*)

Os testes para detecção dos genes *nifH*, *nirK* e *dmdA* foram realizados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) num volume final de 20 µL utilizando o kit da enzima polimerase *DreamTaq*® (Thermo Scientific), no qual foi usado 0,2 mM de cada dNTP, 20 µmol de cada iniciador de escolha, 1,25 U da polimerase *DreamTaq*® (Thermo Scientific), 50 ng de DNA e água ultrapura estéril para completar o volume da reação.

Para seleção de isolados fixadores de nitrogênio, foi realizada a amplificação do gene *nifH*. Esse gene é um dos marcadores genéticos mais utilizados para a identificação de estirpes fixadoras de nitrogênio, pois é um dos principais genes que codificam a nitrogenase, enzima responsável pela redução do nitrogênio atmosférico (N₂) em amônio (NH₄⁺). Para isso, foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores PolF (5'- TGC GAT CCG AAA GCC GAC TC - 3') e PolR (5'- ATG GCC ATC ATT TCA CCG GA - 3') seguindo o protocolo de Poly e colaboradores (2001) e encontrado na tabela 1. Amostras de DNA total de solo foi utilizado como controle positivo da reação e amostras sem adição de material genético foram utilizadas como controle negativo.

Para a identificação de isolados desnitrificantes, foi realizada a amplificação do gene *nirK*. Esse gene codifica a enzima nitrito redutase, responsável pela redução do nitrito (NO₂⁻) em amônia (NH₃). A PCR foi realizada com os iniciadores F1aCu (5'- ATC ATG GTC CTG CCG CG - 3') e o R3Cu (5'- TTG GTG TTA GAC TAG CTC CG - 3') seguindo o protocolo descrito por Hallin

e Lindgren (1999) e encontrado na tabela 1. Amostras de DNA total de esgoto foram utilizadas como controle positivo da reação e amostras sem adição de material genético foram utilizadas como controle negativo.

Já para a identificação de isolados capazes de degradar DMSP, foi realizada PCR visando amplificação do gene *dmdA*. Esse gene codifica a enzima DMSP desmetilase, responsável por mediar o primeiro passo de degradação do DMSP através da via de desmetilação (HOWARD et al., 2006). Para isso, foram utilizados os iniciadores D/all-spFP (5'- TAT TGG TAT AGC TAT - 3') e o D/all-spRP (5'- TAA ATA AAA GGT AAA TCG C- 3') seguindo o protocolo descrito por Varaljay e colaboradores (2010) e encontrado na tabela 1. Amostra de DNA total da água do mar foi utilizado como controle positivo da reação e amostras sem adição de material genético foram utilizadas como controle negativo.

Para detecção da amplificação dos genes acima, foi realizada uma eletroforese a 100V em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1%, utilizando padrão de peso molecular *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas Life Sciences). Após 40 minutos de corrida os positivos foram revelados através da detecção de bandas com 360 pb para o gene *nifH*, 473 pb para *nirK* e 105 pb em luz ultravioleta e com o auxílio do corante intercalante de base SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™).

Tabela 1: Iniciadores e os ciclos de temperatura utilizados para amplificação dos genes de interesse.

Característica funcional	Gene	Sequência iniciador	Sequência iniciador	Temperatura e ciclo
Nitrificação	<i>nirK</i>	PolF (5'-TGC GAT CCG AAA GCC GAC TC- 3')	PolR (5'-ATG GCC ATC ATT TCA CCG GA-3')	94 °C por 2 min; 28 ciclos de 94 °C for 30 s, 57 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min; e 1 ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C
Fixação de nitrogênio	<i>nifH</i>	F1aCu (5'-ATC ATG GTC CTG CCG CG-3')	R3Cu (5'-TTG GTG TTA GAC TAG CTC CG3')	94 °C por 3 min; 30 ciclos de 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, e 72 °C for 2 min; 1 ciclo de

				extensão final de 10 min a 72 °C
Degradação de DMSP	<i>dmdA</i>	D/all– spFP (5'-TAT TGG TAT AGC TAT-3')	D/all–spRP (5'-TAA ATA AAA GGT AAA TCG C- 3')	94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 42 °C por 30 s, e 68 °C for 30 s; e 1 ciclo de extensão final de 5 min a 68 °C

4.12. Identificação taxonômica dos candidatos a compor consórcio BMC

Um total de 38 cepas com resultado positivo para pelo menos uma das características descritas no item 4.11 teve o gene 16S rRNA amplificado e sequenciado. Os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') e 1492R (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') foram usados para amplificação a partir do DNA genômico extraído como descrito no item 4.11.3 seguindo o protocolo descrito na tabela 2. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e sequenciados pela técnica de SANGER pela empresa Macrogen.

Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram processados usando o *Ribosomal Database Project II* (RDP) (COLE et al., 2009) para remover bases de baixa qualidade. As sequências de cada isolado foram utilizadas para montagem de contigs usando Bioedit 7.0.5.3 (HALL, 1999). As sequências do gene 16S rRNA das bactérias foram alinhadas com as sequências do banco de dados NCBI (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências dos isolados escolhidos para compor o consórcio foram depositadas no banco de dados do NCBI sob um número de acesso individual. As cepas de bactérias identificadas como potenciais patógenos humanos ou marinhos, bem como aquelas com atividade antagônica contra qualquer membro do consórcio BMC selecionado (avaliado pelo método de difusão em ágar citado do item 4.11.1. foram excluídas.

Tabela 2: Sequência de iniciadores e ciclos de temperatura utilizados para o gene 16S rRNA.

Característica funcional	Gene	Sequência iniciador	Sequência iniciador	Temperatura e ciclo
Identificação taxonômica	16S rRNA	27 F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3')	1492R (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')	Um ciclo a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 40s, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 2 min; e um ciclo de extensão final por 10 min a 72 °C.

4.13. Preparação do consórcio BMC e solução Placebo

Um total de seis cepas bacterianas: M20 *Bacillus lehensis* (número de acesso NCBI MK308622), M24 *Bacillus oshimensis* (MK308624), M3 *Bacillus lehensis* (MK308617), M1 *Brachybacterium conglomeratum* (MK308603), CM29 *Planococcus rifietoensis* (MK308593), e F2 *Salinivibrio* sp. (MK308616), foram selecionados para compor o consórcio BMC para *M. hispida*, com base nas características benéficas citadas no item 4.11 e os critérios de exclusão citados no item 4.12. O consórcio BMC utilizado no experimento continha um total de 10^8 células por mL. Uma curva de crescimento bacteriano foi realizada para estimar o tempo ótimo de crescimento e o número de células correspondente de cada cepa individual de BMC. Para isso, alíquotas do crescimento de cada cepa cultivadas a 26 °C em 100 mL de meio LB 2,5% NaCl por 8, 16, 22, 30, 42, 48 e 54 h foram coletadas e a densidade óptica (OD600) correlacionada diretamente com o número de unidades formadoras de colônias (UFC). As UFCs foram avaliadas através do cultivo de subamostragem (100 µL) da diluição seriada (1:9 – 100 µL amostra + 900 µL solução 0.85 % NaCl) até a diluição 10^6 em meio LB 2,5% NaCl. As UFCs foram contadas após 24h de crescimento a 26 °C e os resultados obtidos foram normalizados para $\log_{10} \times \text{UFC}_{\text{ml}^{-1}}$ para estimativa da quantidade de células presentes e plotagem em gráfico. As culturas foram coletadas nos seus respectivos tempos ótimos de crescimento (Figura

Suplementar 1 – Capítulo II) e centrifugadas a 5000 g por 2 min. As células foram lavadas 3 vezes com solução salina estéril (NaCl 0,85%), seguida de ressuspensão em 50 mL de solução salina estéril. Para garantir a manutenção da viabilidade, o consórcio BMC foi preparado com no máximo um dia de antecedência. Já o placebo/controle para o tratamento BMC foi composto pela mesma solução salina estéril (NaCl a 0,85%) utilizada para preparar o BMC, daqui em diante referido como tratamento placebo.

4.14. Estrutura do mesocosmo experimental

A rodada experimental do capítulo II foi conduzida no centro de pesquisas científicas do Aquário Marinho do Rio de Janeiro (IMAM-AquaRio), no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. O mesocosmo experimental seguiu o mesmo modelo do descrito no capítulo I item 4.3.1 com algumas adaptações, onde cada aquário consistiu em uma réplica biológica. Dessa forma, o mesocosmo foi composto por 2 banhos-maria (100 cm × 50 cm × 10 cm) por temperatura (total de 4 banhos-maria), onde 5 aquários individuais (cada um com 1,3 L de capacidade, 15 cm × 11 cm × 12 cm) de cada tratamento foram distribuídos aleatoriamente no mesocosmo. Os aquários foram abastecidos com água do mar da estação de pesquisa onde o experimento foi conduzido. Cada aquário possui seu próprio reservatório e bomba de circulação individuais, que era preenchido com 8,7 L de água do mar. A circulação entre o reservatório e os aquários era acionada por uma bomba d'água Mini A (Sarlo Better, São Caetano do Sul, Brasil) a uma vazão de 250 mL min⁻¹, proporcionando uma reposição de dez vezes o volume do aquário por hora. A cada dois dias, 10% da água do reservatório era substituída e a salinidade ajustada para 34 PSU com água deionizada, se necessário. Os aquários receberam circulação de ar contínua individual por meio de bombas de ar (HG-370, Sun Sun) conectadas a mangueiras de silicone e controladores de fluxo. A água do banho-maria era circulada e misturada por duas bombas de aquário (SB 1000A, Sarlo Better) para manter a temperatura homogênea, e não havia troca de água entre os aquários e os banhos-maria. O Full Gauge MT-518ri (Canoas, Brasil) media e controlava a temperatura do banho-maria, acionando o sistema de refrigeração ou

aquecedores conforme a necessidade. Os banhos de água foram conectados a um tanque de 1000 L a 18 °C, para fornecer água de resfriamento por meio de bombas d'água (Better 2000, Sarlo Better) quando o controle de temperatura Full Gauge ativava o sistema. O sistema de aquecimento consistia em dois aquecedores de 100 W (Atman, China) dentro do banho-maria. Parâmetros físico-químicos da água, como pH e oxigênio dissolvido (DO), foram medidos nos dias de amostragem, utilizando uma sonda multiparâmetros (Modelo HI 9.828, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo). Os experimentos seguiram ciclos artificiais dia / noite (12h / 12h) com 150 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ das 06:00 às 10:00 e das 14:00 às 18:00h; e 250 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ das 10:00 às 14:00h, o qual foi modulado com dimmer de luz e tela bloqueadora de luz. Cada aquário individual (réplica) tinha seu próprio sistema de iluminação, consistindo em três LEDs de luz azul e seis de luz branca cada. Quatro fragmentos (~ 7 cm) de *M. hispida* foram colocados em cada aquário, e um único fragmento foi usado aleatoriamente como uma unidade de amostragem para cada tratamento e tempo de amostragem.

4.15. Desenho experimental

Um total de 80 fragmentos de coral de *M. hispida* foram expostos a dois regimes de temperatura, 30 °C (regime de temperatura alta – estresse térmico) e 26 °C (regime de temperatura ambiente – temperatura controle), e dois tratamentos, placebo ou BMCs. Cada aquário consistia em uma réplica completamente independente e cada tratamento usava cinco dessas réplicas independentes. Um fragmento foi usado aleatoriamente como uma unidade de amostragem para cada tratamento e tempo de amostragem. Todos os nubbins de coral foram primeiro mantidos sob as mesmas condições a 26 °C por 30 dias para permitir que eles se aclimassem ao sistema experimental. Para o experimento de alta temperatura, a temperatura foi aumentada, do dia 0 ao dia 8, em 0,5 °C por dia até 30 °C, que foi mantida por 10 dias. Em seguida, a temperatura foi diminuída para 26 °C em 1 °C por dia, seguido por 23 dias de recuperação. Todos os aquários do experimento controle foram mantidos a 26 °C durante os 75 dias do experimento (30 dias de aclimação + 45 dias de experimento). Os pontos de amostragem foram: antes do estresse térmico (T0),

no pico da temperatura (T1), no último dia de alta temperatura (T2) e após o período de recuperação (T3). Amostras do experimento de temperatura ambiente também foram coletadas em paralelo nos mesmos tempos de amostragem. O placebo e os BMCs foram inoculados no primeiro dia do experimento e a cada 5 dias a partir de então; durante os 10 dias de pico de temperatura, as inoculações foram realizadas a cada 3 dias. Uma visão esquemática detalhada do desenho experimental é mostrada na figura 11. As inoculações foram realizadas retirando os fragmentos de coral do aquário e colocando-os em uma placa de Petri estéril para inocular 1 mL do respectivo tratamento acima dos fragmentos. Após a inoculação, os fragmentos foram imediatamente devolvidos aos seus respectivos aquários e as placas de Petri individuais foram enxaguadas na água do aquário.

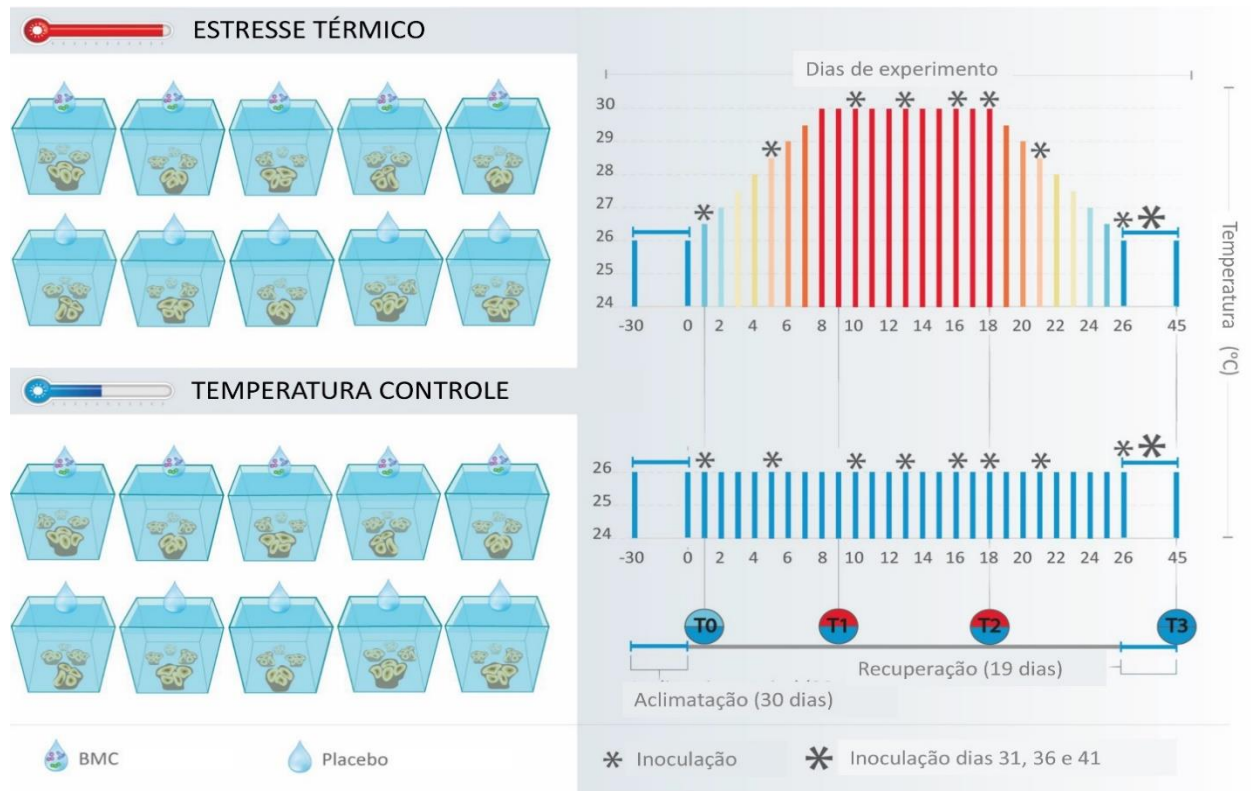


Figura 11: Esquema demonstrando o desenho experimental e o regime de temperatura dos experimentos realizados neste capítulo.

4.16. Avaliação dos parâmetros de saúde do coral

A saúde dos corais foi avaliada durante o experimento através do monitoramento visual do branqueamento e pela eficiência fotossintética das algas endossimbióticas, como descrito no item 4.3.4.2. A resposta visual do coral foi avaliada por pontuação de cor, com base na aparência do tecido: 1) branqueado (> 80% da colônia branqueada, sem pigmentação visível); 2) pálido (> 10% colônia afetada pela perda de pigmento); ou 3) totalmente pigmentado (<10% colônia com coloração pálida). A mortalidade dos corais foi pontuada como 0. O mesmo fragmento utilizado para F_v/F_m foi fotografado a cada tempo de amostragem, com uma câmera digital Canon T3i, nas mesmas condições, e a cor foi pontuada com base na avaliação fotográfica.

4.17. Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S RNAr do microbioma do coral

O microbioma do coral foi avaliado por análise de sequenciamento do gene 16S rRNA. Amostras da camada de muco, tecido e esqueleto do coral foram coletadas com alicates estéreis no momento da coleta. As amostras de cada tempo de amostragem foram trituradas com um pilão e cadinho. O DNA total foi extraído de 0,5 g do triturado usando o kit PowerBiofilm® DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada com o kit Qubit® 2.0 Fluorometer High Sensitivity DNA (Invitrogen, EUA).

Para amplificar as regiões hipervariáveis V5 e V6 do gene 16S rRNA bacteriano, os iniciadores 784F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGGATTAGATACCCTGGTA-3') e 1061R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCRRACGAGCTGACGAC-3') (ANDERSSON et al., 2008) foram usados (iniciadores adicionados com adaptador Illumina). PCRs triplicados (usando 1 µL de DNA molde) foram realizados com o kit Qiagen Multiplex PCR, com uma concentração final do iniciador de 0,3 µM em um volume de reação final de 10 µL. Além das amostras, foram executadas PCRs simuladas (sem entrada de modelo) para contabilizar

os contaminantes putativos do kit. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 95 °C por 15 min, 27 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 90 s e 72 °C por 30 s, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min. Em seguida, 5 µL de cada produto de PCR foram analisados em um gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação bem-sucedida. Os produtos de PCRs triplicados para cada amostra foram agrupados e as amostras limpas usando ExoProStar de 1 etapa (GE Healthcare, Reino Unido). As amostras foram indexadas usando o Nextera XT Index Kit v2 (índices duplos e adaptadores de sequenciamento Illumina adicionados). A adição bem-sucedida de índices foi confirmada comparando o comprimento do produto de PCR inicial com a amostra indexada correspondente em um gel de agarose a 1%. As amostras foram limpas e normalizadas usando o SequalPrep Normalization Plate Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram então agrupadas em um tubo Eppendorf (4 µL por amostra) e concentradas usando o CentriVap Benchtop Vacuum Concentrator (LABNOCO, EUA). A qualidade da biblioteca foi avaliada usando o kit Agilent High Sensitivity DNA no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e quantificada usando Qubit (Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit, Invitrogen). O sequenciamento da biblioteca foi realizado a 5 pM com 20% de phiX na plataforma Illumina MiSeq no KAUST Bioscience Core Lab em 2 × 301 bp de sequências *paired-end* de V3, de acordo com as especificações do fabricante.

4.18. Análise da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene 16S RNAr

As sequências demultiplexadas resultantes do sequenciamento em Illumina HiSeq2000 foram importadas para o programa QIIME2 versão 2019.4 (CAPORASO et al. 2010), onde as análises dos dados foram realizadas. Sequências de baixa qualidade, dereplicação, assim como montagem de contig a partir de sequências complementares e remoção de contig menores que 250 pb foram realizadas utilizando DADA2 *plugin* com os seguintes parâmetros: -p-trim-left-f 5 --p-trim-left-r 5 - p-trunc-len-f 250 --p-trunc-len-r 250, gerando 4775 ASVs (do inglês - *amplicon sequence variants*). A classificação taxonômica das

ASVs foi realizada utilizando o algoritmo de machine learning supervisionado Naive Bayes (q2-feature-classifier implementado pelo pacote scikit-learn 0.20.2 do python) e usando o banco de dados Silva v132 como classificador. As sequências representativas dos ASVs classificadas taxonomicamente foram alinhadas pelo programa MAFFT2 (Q2- alignment *plugin*) e depois uma árvore filogenética construída com o programa FastTree (Q2-phylogeny *plugin*).

Os arquivos resultantes das análises anteriores foram, então, importados no R versão 3.6.0 (usando a função qiime2R) e analisados com o pacote Phyloseq (MCMURDIE e HOLMES, 2013) e dplyr (WICKHAM et al., 2017). Os gráficos de barra com a distribuição das ASVs ao longo do tempo e tratamentos foram gerados utilizando o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2011). Já a estimativa de abundância diferencial de ASVs entre amostras BMC e Placebo do experimento de estresse térmico foram analisadas e geradas utilizando o pacote DESeq2 (LOVE et al., 2014) usando Negative Binomial Distribution (NEB) e Wald Test com valor de corte de $p=0.01$ para serem consideradas diferenciais. Para as análises de NMDS (do inglês *non-parametric multidimensional scaling*), os dados foram transformados em $\log_2(\log x + 1)$ e a ordenação foi realizada com a matriz de distância Bray-Curtis. Os resultados foram plotados com a função plot_ordination usando as ASVs e os tratamentos como variável ambiental para ordenação. A significância dos resultados foi avaliada com PERMANOVA, usando 999 testes de permutação aleatória com pseudo F-ratios por meio da função Adonis do pacote Vegan (OKSANEN et al., 2019). A estrutura da comunidade do microbioma (representada por medidas de diversidade e riqueza) foi avaliada usando índices ecológicos clássicos de alfa diversidade (distribuição de ASVs, Chao1 e Shannon) no platô da curva de rarefação. A significância dos resultados de alfa diversidade entre as amostras de placebo e BMC foram avaliadas usando ANOVA implementado na função ggplot2.

4.19. Metabolômica

O triturado produzido de cada amostra (300 mg) foi homogeneizado com uma solução aquosa de metanol a 80% (1,50 mL) usando pérolas de zircônia e, em seguida, submetida a ultrassom por 8 min em temperatura ambiente. Os

extraídos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram concentrados a vácuo até secar. Este procedimento foi repetido três vezes para recuperação máxima. Os resíduos foram ressuspensos em metanol-*d*4 (200 µL) para aquisição de dados por Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (NMR – do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*). As leituras foram realizadas pelo equipamento Bruker Avance III de 600 MHz equipado com uma criosonda TCI HC/ND de 5 mm e um amostrador automático SampleJet. O experimento Noesypr1D. foi usado para avaliar o perfil metabólico comparativo do conjunto de amostras e os experimentos 2D HSQC e HMBC (hsqcedetgpsisp2.2 e hmbcetgpl3nd, respectivamente) foram usados para confirmar a identidade dos principais compostos. Frascos vazios submetidos aos procedimentos de extração, porém sem amostras, foram utilizados como branco. Os espectros obtidos foram processados usando o programa NMRpipe e importados para o MATLAB para normalização, escalonamento e análises multivariadas (ROBINETTE et al., 2011). Análises discriminativa de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA – do inglês *Partial least squares-discriminant analysis*) foram feitas usando resolução completa dos dados de NMR e os boxplots foram construído usando a área sob a curva dos picos relacionados ao Dimetilsulfoniopropionato (DMSP 2,89–2,88 ppm) e Dimetilsulfóxido (DMSO 2,59–2,55 ppm). A diferença estatística de DMSP e DMSO entre os tempos de amostragem e tratamentos foi avaliada com Teste t de amostras independentes.

4.20. Metatranscriptoma

4.20.1. Extração de RNA e sequenciamento

Para compreender os mecanismos associados à TR e TS observados no final do experimento (T3), amostras de RNA foram extraídas tanto dos corais tratados com BMC quanto dos corais tratados com placebo do experimento de alta temperatura (30 °C) e ambiente (26 °C), totalizando 20 amostras. Para isso foram utilizadas amostras de fragmentos de corais (muco, tecido e esqueleto) instantaneamente congeladas após a coleta, como descrito no item 4.10, porém acrescidos de solução DESS (solução contendo DMSO, EDTA e saturada com NaCl). Essas amostras foram maceradas em condições secas com auxílio de

nitrogênio líquido, para preservar a integridade do RNA, e a extração foi conduzida seguindo o protocolo com Trizol sugerido pelo centro de pesquisa que realizou o sequenciamento. Resumidamente, os triturados relativos de cada amostra foram homogeneizados com Trizol (completando tubo até cobertura da amostra). Após 5 minutos de incubação, 200 µL de clorofórmio foi adicionado para cada 1 mL de Trizol, e depois as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 2-8 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de trizol originalmente utilizado. Depois de 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas sob as mesmas condições anteriormente citada. O precipitado contendo RNA foi lavado com solução de etanol a completar concentração final de 80% e novamente centrifugada 7.500G por 5 minutos a 2-8 °C. O sobrenadante foi descartado e o etanol remanescente evaporado em temperatura ambiente. Após choque térmico dos tubos à 70 °C por 3 minutos, o RNA extraído foi ressuspensionado em água ultra pura da Thermo Fisher. Todo o procedimento foi realizado utilizando materiais e soluções livres de nucleases. Os extraídos foram tratados utilizando o kit Ambion's Dnase Treatment (Thermo Fisher) para remoção de moléculas de DNA, e, posteriormente, purificados utilizando o kit Rneasy (QIAGEN). As amostras de RNA foram quantificadas em aparelho Nanodrop e sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq 6000 (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) no Instituto J. Craig Venter utilizando leituras de *paired-end* a 2x150 pb.

4.20.2. Análise dos transcritos

As leituras transcriptômicas foram controladas por qualidade usando KneadData v0.7.4 com o genoma humano GRCh38.p13 como uma referência para potencial descontaminação. Os transcriptomas *de novo* foram co-montados usando rnaSPAdes v3.13.1 (BUSHMANOVA et al., 2019), produzindo 520.555 transcritos representativos de 496.603 genes putativos. O programa TransDecoder v5.5.0 (HAAS et al., 2013) foi utilizado para a modelagem de genes seguindo diversas etapas para minimizar falsos positivos. Sendo essas: 1) TransDecoder.LongOrfs, utilizando o argumento transcript-to-gene de mapeamento atribuídos por rnaSPAdes, para gerar quadros de leitura aberta putativos (ORFs); 2) hmmscan (hmmer v3.3.1 suite) (EDDY, 2011) para

identificar domínios de proteína usando os bancos de dados PFAM v33.1 e TIGRFAM v15.0; 3) Diamond v0.9.30.131 (BUCHFINK et al., 2014) blastp contra todos os proteomas de Scleractinia (corais pétreos) disponíveis no NCBI (GCA_002571385.1, GCF_002042975.1, GCA_003704095.1, GCF_004143615.1, GCF_002571385.1, GCF_002571385.1 e GCF_000222465.1); e 4) TransDecoder.Predict com as ORFs putativas do item (1), os domínios de proteína de (2) e os alinhamentos de (3) usando o argumento `--single_best_only`. Este procedimento gerou um único ORF por transcrição, rendendo 130.183 ORFs de 114.118 genes.

Genes de alta qualidade foram anotados usando Diamond's blastp contra o banco de dados do NCBI (v2020.04.01). As linhagens taxonômicas foram extrapoladas do NCBItaxid usando a função `get_taxonomy_lineage_from_identifier` do `soothsayer` v2020.08.24 (<https://github.com/jolespin/soayer>) utilizando backend `ete3` (HUERTA-CEPAS et al., 2016). PhyloDB v1.076 foi usado para anotações adicionais, e atribuição de ortólogos utilizando KEGG.

4.20.3. Avaliação de ortogrupos

Homólogos de genes de coral foram classificados em ortogrupos para aumentar a confiança na anotação e, portanto, na inferência funcional. Os ortogrupos foram identificados usando o programa OrthoFinder v2.4.0 (EMMS e KELLY, 2019) com as proteínas de alta qualidade geradas a partir do procedimento utilizando TransDecoder e todos os proteomas de Scleractinia listados anteriormente.

4.20.4. Avaliação de Expressão Diferencial do transcriptoma

A expressão diferencial foi avaliada por meio de uma perspectiva genômica comparativa para aumentar a interpretabilidade ecológica. Para isso, as contagens para cada ortogrupo foram agregadas, e, posteriormente, filtradas para incluir apenas ortogrupos que estavam em pelo menos 95% das amostras, produzindo uma tabela com 17.202 características de ortogrupo.

Para verificar a expressão diferencial do ortogrupos nas amostras, o conjunto de 17.202 ortogrupos gerados pelas etapas anteriores foi analisado utilizando exactTest no programa edgeR v3.28.0 (ROBINSON et al., 2010). A distribuição e os grupos diferencialmente expressos (DEGs – do inglês *differentially expressed groups*) foi visualizado usando plot_volcano do pacote soothsayer Python (<https://github.com/jolespin/soothsayer>). Cada condição tinha pelo menos três réplicas biológicas. As condições investigadas foram as seguintes: (1) placebo (26 °C) vs placebo (30 °C) [FDR <0,01, 408 DEGs]; (2) BMC (26 °C) vs BMC (30 °C) [FDR <0,02, 34 °C]; (3) placebo (30 °C) vs BMC (30 °C) [FDR <0,05, 1 DEGs]. Como o tratamento com placebo consistiu apenas de solução de NaCl a 0,85%, os DEGs que mostraram uma diferença significativa (FDR $p < 0,01$) entre "placebo 30 °C x placebo 26 °C" foram considerados ortogrupos afetados pelo estresse térmico e aqueles que apresentavam anotações KEGG-Pathway nesta condição foram usadas para detectar a regulação para cima ou para baixo em outras amostras. Além disso, também procuramos manualmente por ortogrupos relacionados com estresse oxidativo e térmico, bem como reparo de DNA. Os valores de regulação dos genes foram considerados para avaliar as diferenças entre as amostras e o valor de FDR utilizado apenas para justificar o valor de corte utilizado no estudo. As funções foram consideradas afetadas pelo tratamento com BMC apenas se mais de 50% dos genes pesquisados tivessem o mesmo padrão (para cima ou para baixo regulado) pelo BMC 30 °C quando comparado com Placebo 30 °C.

5. Resultados e Discussão

Os resultados e discussão desta tese estão apresentados em forma de capítulos, referentes aos artigos científicos gerados com dados obtidos a partir dos experimentos descritos nos tópicos anteriores. Outras produções técnico-científicas também realizadas no período de doutoramento, seguem em forma de anexo.

- Capítulo I: **OPENING THE HEAT BOX: MULTI DOMAIN ANALYSIS REVEALS DIFFERENT FUNCTIONAL AND MICROBIAL ASSOCIATION WITH THERMAL RESISTANT AND SENSITIVE CORALS.** Artigo submetido para revista *The ISME Journal* em março de 2020.
- Capítulo II: **CORAL MICROBIOME MANIPULATION ELICITS METABOLIC AND GENETIC RESTRUCTURING TO MITIGATE HEAT STRESS AND EVADE MORTALITY.** Artigo submetido para a revista *Nature Microbiology* em novembro de 2020.

5.1. Capítulo I

OPENING THE HEAT BOX: MULTI DOMAIN ANALYSIS REVEALS DIFFERENT FUNCTIONAL AND MICROBIAL ASSOCIATION WITH THERMAL RESISTANT AND SENSITIVE CORALS

ERIKA P. SANTORO¹; HELENA D. M. VILLELA¹; GUSTAVO A. DUARTE ^{1,2};
JOÃO P. SARAIVA³; CAREN L. S. VILELA¹; CAIO T.C.C. RACHID¹;
RODOLFO B. TOSCAN ³; ANGELA M. GHIZELINI¹; RENE KALLIES ³;
ANDREW MACRAE¹; TORSTEN THOMAS⁵; DAVID G. BOURNE ^{6,7}; ULISSES
NUNES DA ROCHA ³; RAQUEL S. PEIXOTO^{1,2,4*}

¹ Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

² IMAM-AquaRio – Rio de Janeiro Aquarium Research Center

³ Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany

⁴ Genome Center, University of California, Davis, CA, United States of America

⁵ Centre for Marine Science and Innovation, School of Biological, Earth and Environmental Sciences, University of New South Wales, Australia

⁶ College of Science and Engineering, James Cook University, Townsville, Australia

⁷ Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia

*Corresponding author

Phone: 55 21 2562-6740

e-mail: raquelpeixoto@micro.ufrj.br; rpeixoto@ucdavis.edu

Running title: Thermal Resistance Mechanisms in Corals

Sentence summarizing the manuscript: Pulse thermal resistance in corals is associated with differential ability to handle damages on PSI and II systems.

Address: Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Av. Carlos Chagas Filho, 373. Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco E sub-solo, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 21941-902

ABSTRACT

Thermal-resistant coral colonies are present in many reef ecosystems; however, little is known about host and microbiome factors that contribute to sensitivity or resistance to thermal stress. We determined heatwaves regimes to in pulse thermal-sensitive (TS) and pulse thermal-resistant (TR) coral colonies to correlate holobiont responses to different exposure temperatures with taxonomic groups and their functions. We observed significant recovery of photosynthetic potential for TR corals, while all sensitive corals bleached at elevated temperatures. The coral phenotypes harbored distinct bacterial communities with indicator taxa of resistance and specific key putative holobiont functions being correlated with TR or TS coral. Most notably, ORFs for photosystem I and II proteins, cytochrome c oxidase (COX) and F-type ATPase were upregulated in TR corals during peak thermal stress, indicating that these corals can maintain the homeostasis among cellular respiration and heat stress or even uptake photosynthetic organisms, which can improve their oxidative repair rate and, consequently, resistance to bleaching.

Keywords: thermal-resistant corals, function, metagenome, multi-domain analysis, coral microbiome

Introduction

Coral reefs are vulnerable ecosystems threatened by accelerated global climate change (1). Bleaching events have recently hit reefs worldwide, resulting in some places of up to 50% loss of corals (1). The Inter-Government Panel on Climate Change (IPCC, 2014) predicts further increases in sea surface temperatures and unprecedented marine heatwaves to drive massive coral bleaching events, contributing to the continued degradation of coral reefs and the loss of animals that depend on them for their survival.

It has been reported that the heat tolerance observed for corals in naturally warm waters is reflected in patterns of gene expression and that such resistance can be acquired through local acclimatization (2). However, even corals selected and adapted to reefs that are continuously exposed to extreme environmental conditions, including high temperatures, may not survive pulse stressors, such as heatwaves (3), and thus experience mass-bleaching events. Regardless, individual coral colonies within the same reef (with or without previous exposure to heat stress) can present different levels of tolerance, and some populations with superior thermal tolerance can emerge, especially during pulse heating events (4).

Different components could contribute to increased thermal tolerance in corals, from coral genetics to symbiotic relationships with more resistant genera of Symbiodiniacea (5). Microorganisms may also contribute to corals health and adaptation in the natural environment through the manipulation of a beneficial portion of the native microbiome. Beneficial Microorganisms for Corals (BMCs) (6) demonstrated to increase coral thermal resistance, though the mechanisms behind these processes are being largely unknown. Identifying the underlying

mechanisms that convey resistance to corals will provide new potential BMCs or genetic targets and ultimately determine the feasibility of coral probiotics and/or coral microbiome manipulation approaches to sustain corals faced with rapid environmental change.

However, surveys of the responses and defense mechanisms associated with pulse thermal resistant corals, are currently limited and mostly based on predictive tools, field surveys on historically thermal resistant corals (not submitted to pulse stress) or in short surveys with no correlation with health status. Besides, coral holobionts consist of the host and all its associated microbes including viruses, bacteria, archaea and micro-eukaryotes (6), which haven't been investigated holistically, using a multi-domain approach. Here, we identified and marked colonies of *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902) showing visual thermal resistance (TR) (i.e. not bleached) as well as those with sensitivity (TS) (i.e., bleached) in the field during a bleaching event in the coast of Bahia, Brazil, in 2016. After the bleaching event, fragments of TR and TS colonies were transferred to experimental tanks to determine their thermal thresholds and observe the microbiome dynamics during a heat pulse stress. Metagenomic and microbiome profiling of TR and TS corals showed that different phenotypes have distinct microbial communities and holobiont functional profiles. Indicator microbial taxa and putative functional genes were correlated with TR corals, which may potentially contribute to the thermal tolerance of these individual coral colonies.

Results

*Different phenotypes of *Mussismilia hispida* present distinct responses to a thermal anomaly*

During the 2015/2016 coral bleaching event observed in the Brazilian coast we identified *Mussismilia hispida* coral colonies that displayed signs of both thermal resistance (TR) and thermal sensitivity (TS) to bleaching in the field (13°56'10.97"S; 38°55'38.71"W). TR and TS colonies were randomly distributed in the coral population of this site, with approximately 5% of the colonies displaying bleaching resistance. TR colonies that displayed values of maximum potential quantum efficiency of Photosystem II (F_v/F_m) higher than 600 units, while TS colonies displayed values lower than 300. TR and TS colonies were tagged and collected two months after, when TS colonies were increasing F_v/F_m values (up to 600) and recovering from the bleaching in the field.

*Colonies of *Mussismilia hispida* demonstrate difference in the associated microbiome and thermal tolerance*

16S rRNA gene sequencing analysis of TR and TS colonies sampled in the field indicated distinct bacterial communities (Fig. 1). Non-metric multidimensional scaling (nMDS) analyses demonstrates that both coral phenotype ($p= 0.0047$; Two-way PERMANOVA) and sampling times (F1 – first field sampling during bleaching event and F2 – second sampling after recovery) ($p= 0.0001$; Two-way PERMANOVA), as well as the interaction between these factors ($p= 0.0159$; Two-way PERMANOVA) correlated with changes in the bacterial community. In addition, the bacterial communities associated with TS or

TR also differed in richness (Chao and number of operational taxonomic unit distribution's indexes; $p < 0.05$) and relative abundance of bacterial groups at different taxonomic levels (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1).

Two mesocosm experiments were performed to explore the thermal thresholds of the TR and TS phenotypes plus details on the dynamics of the associated microbial communities and the putative functional traits of the coral holobiont during a thermal pulse stress (Supplementary Fig. S2). Pilot experiments identified that TS corals bleached at 30.5°C, while no visual signs of bleaching were observed in TR colonies (results not shown). These results guided experimental design where four replicate coral fragments (in individual aquariums) for each phenotype were subjected to a pre-peak temperature (29.5°C to TS and 30.5°C to TR) for 10 days and then 4 days of peak temperature (30.5°C to TS; 32°C to TR). Coral fragments of each replicate were sampled on the first day of experiment (T0), after the peak of temperature (T1) (30.5°C to TS; 32°C to TR) and after 15 days of recovery (T2) (26°C). The different phenotypes of *M. hispida* had distinct responses under increasing temperature regimes. Consistent with the field observations, TR fragments did not present visual signs of bleaching or tissue damage throughout the experiment, and all replicates decreased only 1 unit on the Coral Health Chart after the heat stress peak (T1), at 32°C (Supplementary Fig. S3). In contrast, TS fragments presented severe visual bleaching signs just after the heat stress peak (T1) at 30.5°C, followed by tissue necrosis and death (Supplementary Fig. S3). After 3 days of recovery at 26°C, one of the TS fragments displayed whole fragment mortality, and at end of the experiment two fragments remained severely bleached, and one fragment decreased two units relative to the Coral Health Chart (Supplementary Fig. S3).

These results were corroborated by the photosynthetic potential of the associated symbiotic algae in TS and TR corals, as evaluated by F_v/F_m measurements (Fig. 2 A and D, respectively). Although a decrease of 15% on the F_v/F_m average was observed for TR, from day 1 to the peak of temperature (32°C) ($p < 0.05$), at the end of the experiment, at 26°C, those corals had no significance difference in average F_v/F_m compared to day 1 ($p = 0.66$). Thermal sensitive (TS) corals however presented a significant decrease of 29% for the average F_v/F_m from day 1 to the peak of temperature (30.5°C) ($p < 0.05$), and continued to decrease by 42.5% at the end of the recovery period at 26°C compared with the beginning of the experiment ($p < 0.05$).

Bacterial communities from thermal resistant corals do not shift under pulse thermal stress

The diversity of the microbial communities of each coral phenotype was assessed by 16S rRNA amplicon sequence analysis. Although no significant differences in alpha diversity, from the beginning (T0) to the end of the experiments (T2), were observed for both TR and TS corals (Fig. 2), the TR microbiome seemed to be more stable and consistent than the TS one as assessed by beta diversity measurement using Bray-Curtis dissimilarity. Pulse thermal stress promoted significant changes in the bacterial structure of TS corals, which shifted significantly during the applied thermal stress (from T0 to T1; $p < 0.05$, PERMANOVA) but did not shift significantly from the peak to the recovery period (T1 to T2, $p = 0.062$, PERMANOVA; Fig. 2B), when the temperature returned to 26°C. In contrast, no significant shifts in the bacterial

communities harbored by TR corals was observed over time (from T0 to T1 and T2), even under thermal stress (Fig. 2E).

The most abundant bacterial phyla in both TS and TR corals were Proteobacteria (Sensitive: T0 74% - T1 63% - T2 48%, ± 0.046 , ± 0.16 , ± 0.06 ; Resistant: T0 42% - T1 41% - T2 50% ± 0.28 , ± 0.16 , ± 0.10 ; Mean, SD), followed by Bacteroidetes (Sensitive: T0 5% - T1 10% - T2 16%, ± 0.03 , ± 0.04 , ± 0.04 ; Resistant: T0 10% - T1 11% - T2 17%, ± 0.08 , ± 0.02 , ± 0.09 ; Mean, SD) and Firmicutes (Sensitive: T0 5% - T1 3% - T2 18%, ± 0.03 , ± 0.22 , ± 0.29 ; Resistant: T0 33% - T1 30% - T2 16% ± 0.45 , ± 0.22 , ± 0.051 ; Mean, SD) (Supplementary Fig. S4 and S5, for TS and TR respectively).

Indicators taxa of thermal stress and resistance

Corals subjected to a bleaching event in the field and heat pulse stress in mesocosms, had different indicators taxa for each phenotype coral and sampling time. Field samples were clustered by the sampling time in PC-ORD ordination software to explore phenotype indicators taxa (Fig. 3 and Supplementary Supplementary Table S1 and S2). Samples from the mesocosm experiments, were clustered by sampling time separately, for each phenotype (TS or TR) (Fig. 3 and Tables S3 and S4, for TS and TR respectively).

From the 165 most abundant OTUs from field samples, 23 were more associated with the TR phenotype field samples (Indicator Value – IV > 60 and $p < 0.05$, more detail in Material and Methods section) and of these, 16 OTUs were classified as Proteobacteria (Alphaproteobacteria or Gammaproteobacteria) (Supplementary Supplementary Table S1). None of the OTUs from field samples were statistically associated with the sensitive phenotype. The relative

abundance of 54 OTUs increased after the bleaching event (F2) for both phenotypes in the field (TS and TR), with a subset of 6 OTUs including Campylobacteraceae (3 OTUs), Acidaminobacteraceae (2 OTUs) and Cryomorphaceae (1 OTU) (100 IV; $p < 0.01$) exclusively being found at this sampling timepoint (Supplementary Table S2). TS corals held in mesocosms displayed a high relative abundance of OTUs affiliated with Proteobacteria, which were indicators of the T0 sampling time point and were reduced in relative abundance following heat pulse stress (Supplementary Table S3). OTUs identified as Pirellulaceae, a family within the Planctomycetes phylum (100 IV; $p < 0.05$), and *Luteolibacter*, a genus within the Verrucomicrobia phylum (100 IV; $p < 0.05$), increased in relative abundance at T1 and T2 in response to the heat pulse that TS corals were subjected to. OTUs from the family Pirellulaceae were identified as indicator taxa of TR phenotype corals, with 6 out of 9 OTUs increasing in relative abundance following the heat stress (T1) (Fig. 3, Supplementary Table S4). Many indicator taxa of TR corals sampled at T0 and T2 were affiliated with Alphaproteobacteria. Six OTUs with no classification (only identified as Bacteria) were identified as indicators taxa for T1 and T2 (after heat stress), suggesting that some taxa correlated with coral resistance/response to heat stress are still unknown.

Functional profiles and correlations changes during a thermal stress event

The functional gene profiles derived from TR and TS colonies subjected to heat stress in the mesocosm experiment were different. A total of 31,753,707 ORFs were found (average length 2888 nt; min 200 nt, max 125,922 nt) with 9,821 ORFs mapping to previously annotated Symbiodinaceae genomes. 9,478

ORFs displayed significant differences in relative abundance between TR coral samples at the beginning of the experiment (T0) and at the peak temperature (T1) ($p < 0.05$; determined by calculating the least square means and p-values were adjusted by False Discovery Rate (FDR) method). In TS corals a total of 4,265 ORFs were statistically different ($p < 0.05$) in relative abundance when comparing samples from the beginning (T0) to the peak of temperature (T1).

To evaluate how the functional traits are distributed among the domains, as well as their correlation with each coral phenotype, ORFs were assigned to viral (V), prokaryotic (P) and eukaryotic (E) origin (bins) (ratios of V, P and E reads are described in Supplementary Table S5). Some of the ORFs were assigned to multiple domains, such as prokaryotes and viruses (PV), viruses and eukaryotes (VE), prokaryotes and eukaryotes (PE), prokaryotes and viruses and eukaryotes (PVE) and hence total values are often greater 100% summed over all domains.

Further, statistically different ORFs were assessed for mitochondrial origin (Tables S6 and S7, for TS and TR respectively) with only ORF (k141_1012016) assigned to mitochondria and subsequently removed from the analysis. From the significant ORFs associated with TR corals, 411 were exclusively mapped onto viral bins, 1017 to prokaryotic bins, 319 to eukaryotic bins and 126 were found in more than one of these groups (PV, VE, PE and PVE; Fig. 4, Supplementary Table S8). 7,605 ORFs could not be assigned to any of the groups (Supplementary Table S8). From the significant ORFs associated with TS corals, 37 were exclusively mapped to viral bins, 358 were recovered from prokaryotic bins, 525 were mapped to eukaryotic bins and 212 ORFs were mapped to more than one domain (Fig. 4, Supplementary Table S8). 3124 ORFs were not mapped to any group.

Among the identified ORFs associated with TR and TS phenotypes, most had no annotation available in the KEGG or SwissProt database. Overall it was possible to observe a decrease in the relative abundance of ORFs mapped to ATP synthesis KEGG category in TS corals after thermal stress. On the other hand, ORFs mapped to energy metabolism increased due to thermal stress (Supplementary Fig. S6). In TR colonies, most of the ORFs with statistical differences between T0 and T1 encode for photosynthesis related proteins (Photosystem I and II, F-type ATPase, Calvin cycle, Cytochrome b6f complex). These ORFs increased in abundance after thermal stress (T1), and most of them did not map to any bin, except for 13 assigned to virus and 20 belonging the prokaryotes (Fig. 5 and Supplementary Table S8). Additionally, the relative abundance of stress-related ORFs annotated as chaperones (HSP20 and DNAJC5), as well as a virus histone demethylase factor (JMJD1C), were greater in the T1 samples than in the T0 samples from TR corals, and they were exclusively assigned to prokaryotes (Supplementary Table S8). After thermal stress (T1), TR corals demonstrated biosynthesis metabolic profile, increased the relative abundance of genes that encode to Phosphoribosyl diphosphate (PRPP), serine, triacylglycerol, ceramide, N-glycan precursor, C5 isoprenoid and trehalose biosynthesis (Fig. 5).

In contrast, the relative abundance of significantly different ORFs in TS corals decreased following the applied thermal stress. Among them, are ORFs encoding for protein involved in photosynthesis (reductive pentose phosphate, Cytochrome b6 complex proteins) and metabolic pathways, such as heme and leucine biosynthesis as well as cell structural proteins (galaxy, extracellular matrix protein A, Actin cytoskeleton-regulatory complex protein) (Fig. 5).

Discussion

This study investigated the responses of Thermal Resistant (TR) and Thermal Sensitive (TS) corals and documented the microbial communities and putative functional genes correlated with pulse thermal stress. Coral fragments from colonies collected from the same reef area, previously marked in the field as TS or TR during a bleaching event, demonstrated different responses to pulse thermal stress (heatwave) in mesocosm experiments, confirming their classification as TR or TS colonies. Thermal stress is one of the major factors contributing to coral reefs decline globally (7), however recurrent exposure may lead to the adaptation of the coral metaorganism (5, 8, 9).

Microbial community composition and function change fast and may be a more versatile and rapid way of modulating metaorganisms responses when compared to the genetic adaptation of the coral host, in particular to pulse event due to climate change. Microbial modulation therefore may play a role in host resilience, being one of the factors connected with the emergence of resilient corals in the field (8, 9). In this regard, Ziegler and collaborators (9) have identified correlations between different microbiomes associated with corals from thermally variable reefs and demonstrated microbiomes changed when corals were reciprocally transplanted. To date however, the responses of the coral metaorganism to pulse thermal stress are still poorly resolved (10). Data that correlates pulse thermal resistance with specific coral host traits and functions can help to elucidate mechanisms underpinning the observed resilience of corals.

Although TR corals showed a significant drop in the average F_v/F_m during peak stress, these corals did not visually bleach and fully recovered their F_v/F_m

values after the recovery period at 26° C. In contrast TS corals, bleached (F_v/F_m average 57.5% lower than the observed from day 1) and presented 25% mortality even after the recovery period. The maximum quantum yield of zooxanthellae Photosystem II (F_v/F_m) is a widely used indirect metric for coral health and its response to thermal stress (11). The decrease in F_v/F_m values suggests non-specific inactivation due to damage of photosystem II electron transport and usually precedes the loss of the *Symbiodonium* by the host (12). Not only did the photosynthetic capacity of TR corals remained significantly higher than TS after a heatwave simulation, ORFs that encode proteins of Photosystem I (psaA, psaB, psaC) and II (psbA, psbB, psbC, psbD, psbE) and ORFs identified as F-type ATPase (ATP0F0C, ATPF1B, ATPF1A) and cytochrome b complex (petA, petB), which are all connected to mechanisms to cope with higher temperatures (as discussed below), were significantly increased in TR corals following the thermal stress (T2). Thermal stress can cause damages through the increase of reactive oxygen species (ROS) production, overwhelming the oxidative repair mechanisms (13) and therefore reductions on F_v/F_m metrics indicate damage to the photosynthetic apparatus of the corals' symbionts.

Stress-control related genes such as prokaryotic chaperones (HSP20) and a virus histone demethylase factor (JMJD1C) were significantly associated with TR corals. Heat shock proteins itself are hypothesized to play an important role in coral resistance, being differentially expressed in thermal tolerant cultures of Symbiodinaceae under heat stress (14). The histone demethylase factor (JMJD1C) has previously been demonstrated to be an important factor to cope with heat stress during oyster development (15). The higher relative abundance

of JMJD1C might also imply a role of histone methylation on temperature adaptation of corals.

During bleaching, reduction of the Symbiodiniacea population occurs and the remaining PSI and II systems can be overwhelmed with photorespiration increasing (16). Here we observed a decrease of F_v/F_m values and increases of ORFs encoding PSI and II systems proteins were detected in TR corals during the heat stress, which might minimize the overwhelming process on photosynthetic systems during a bleaching event.

Besides, although cytochrome c and ATP synthase are both central components of the respiratory electron transport chain, they can be inhibited by thermal stress. This is due to the oxidative and thermal stress in the host's endoplasmic reticulum resulting in the expulsion of cytochrome c from the mitochondria, hence triggering a cellular apoptosis process (17). Inhibition of cellular respiration hampers the ability of the host to survive or recover and can represent the release of intact Symbiodinaceae with effective photosystems (18). The significant increase in the abundance of ORFs for cytochrome c oxidase (COX) and F-type ATPase in thermal resistant corals, mainly during peak thermal stress, may indicate that they can maintain the homeostasis among cellular respiration and heat stress, which can improve the oxidative repair rate (19).

In addition, stress caused by temperature modulated the microbial community response of TS corals over time, in mesocosms, while no significant shifts in community structure were observed for TR colonies (see Fig. 2). Field colonies of TR and TS phenotypes harbored distinct bacterial communities, which varied differently as a response to the *in situ* thermal stress. TS corals demonstrated a more variable microbial community than the TR corals ($p < 0.05$),

based on the dispersion of the replicates in NMDS plot after heat stress. Zaneveld et al. (20) proposed that metaorganisms in a dysbiotic process present more variable communities induced by stochastic changes when exposed to stress. These observations could suggest that TR corals do not trigger the same process of dysbiosis and collapse of their regular microbiome, remaining less diverse and stochastic and therefore maintaining groups harboring key genes that benefit the coral host, including some that contribute to thermal resistance. For corals subjected to thermal stress in mesocosms, there were ORFs correlated to TR colonies and associated with mechanisms of protection against stress, providing some support to the theory that the bacterial community could be a key component associated with thermal resistance and resilience in corals, through maintenance of holobiont homeostasis (6, 8, 9).

A recent survey from the American National Academies of Science (7) have summarized the potential tools being investigated to increase coral resilience in the face of rapidly changing ocean conditions. The genetic manipulation of corals and their associated BMCs (6) were among the discussed interventions. Disentangling the functional mechanisms, as well as multidomain correlations associated with TR phenotypes may strongly support the development of strategies to mitigate the harmful effects of climate change, by identifying key genetic and microbial targets. Therefore, based on our data, we hypothesized that the specific ORFs encoding photosystem I (*psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaF*) and II (*psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*), cytochrome c oxidase (COX), F-type ATPase, cytochrome b complex (*petA*, *petB*, *petD*) and chaperones (HSP20, DNAJC5, *ftsH*), as well a specific virus histone demethylase factor (JMJD1C), are potentially correlated with mechanisms of thermal resistance for Symbiodinaceae

and the host itself. We show evidence that pulse thermal resistance in corals is associated with the ability of TR corals to cope with the thermal-triggered damaging effects on PSI and II systems, through specific ORFs encoded proteins. These ORFs represent key targets to be further investigated in microbial (BMC) and genetic manipulation approaches, as well as the selected bioindicator groups found in resistant corals.

Material and Methods

Ethics approval and consent to participate

Permission for sampling was obtained from the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO). The microbial survey permits were obtained from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) and SISGEN (Number A620FE5).

Sampling procedures

The samples were collected by snorkeling during the 2015/2016 mass bleaching event on July 3rd 2016 (F1) and on the again on the August 24th 2016 (F2) in a semi-enclosed reef lagoon, at Taipu de Fora beach in the municipality of Maraú, state of Bahia, Brazil. We identified a region of the reef lagoon in which *Mussismilia hispida* were affected and unaffected by the bleaching at the same depth (1.5 m) and under the same irradiance (around 350 $\mu\text{Mol.photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ measured using a pulse-amplitude-modulated fluorometer (diving-PAM)). In order to define the resistance or sensitivity of the *M. hispida* colonies during the bleaching event, the photosynthetic efficiency of the zooxanthellae (F_v/F_m) was measured with a Diving-PAM. The colonies were previously covered with

aluminum foil for 20 minutes for dark adaptation. Both phenotypes were sampled at F1 and F2 and transported to the laboratory in double plastic bags containing seawater for use in mesocosm experiments. They were transported in Styrofoam boxes containing 800g of ice in order to maintain controlled temperature during and avoid extra stress during the transportation. As soon as they arrived at the laboratory, they were transferred to the mesocosm tanks and monitored by F_v/F_m and morphological measurement until their acclimatization (10 days in the system).

Mesocosm design

The mesocosms used in the experiments consisted in four aquariums with capacity of 1.3 L each (15 cm x 11 cm x 12 cm) set into a rectangular water bath (190 cm x 50 cm x 10 cm) per treatment (total of 8 aquariums, 4 replicates per treatment per experiment). The aquariums were supplied with natural seawater captured from the coasts near the research station where the experiment was performed. Each aquarium had its own 26L circulation sump, filled with 10 L of seawater. The aquarium/sump water was in constant circulation by a water pump (Mini A, Sarlo Better, São Caetano do Sul, Brazil) at a flow rate was 250 mL min⁻¹ providing a tenfold replacement of the aquarium volume per hour. Every two days 10% of the sumps water was replaced. The aquariums also received individually constant air circulation through air pumps (HG-370 - Sun Sun) connected to silicone air holes and flow controllers. The water of the water bath was circulated and mixed by two aquarium pumps (SB 1000A, Sarlo Better) to maintain homogeneous temperatures and there was no water exchange between the aquariums and the water baths. A Full Gauge controls MT-518ri (Canoas,

Brazil) measured and controlled the temperature of the water bath activating the cooling system or heaters as necessary. The water baths were connected with a 1000 L water tank at 18°C to feed it with cooling water through water pumps (Better 2000, Sarlo Better) when temperature control Full Gauge activated the system. The heating system consisted in two 100 W heaters (Atman, China) in the water bath. Salinity was adjusted every two days with distilled water, if necessary. Physical-chemical parameters of the water, including pH, salinity and dissolved oxygen (OD) were measured using a multiparameter probe (Model HI 9,828, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo). Both experiments followed natural day/night cycles (12h/12h) and were performed with three fragments (~ 7 cm) of *M. hispida* placed into each aquarium, and a single fragment was randomly used as sampling unit for each treatment and sampling time.

Mesocosm experiments

The thermal resistant (TR) corals were submitted to a simulated heatwave, warming up from 26°C to 30.5°C after which the temperature was maintained for 10 days, followed by 4 days at 32°C. Corals previously identified in the field as thermal sensitive (TS) were submitted to a less intense heatwave in a parallel experiment, warming up from 26°C to 29.5°C after which the temperature was maintained for 10 days, followed by 4 days at 30.5°C. The different peak temperatures were based on previous pilot experiments, where sensitive corals died at 32°C, while resistant ones did not present any signs of stress at 30.5°C nor at 32°C. For both experiments, following the initial 10 days of acclimatization at 26°C, the first sampling (T0) was performed. Then the temperature was gradually increased 0.5°C per day to reach “pre-peak temperature” (30.5°C for

resistant and 29.5°C for sensitive corals). Coral fragments were maintained at “pre-peak temperature” for 10 days. Then the temperature was again increased (0.5°C per day), up to 32°C for resilient fragments and 30.5°C for the sensitive ones, and kept at this peak for 4 days, therefore mimicking the worst-case scenario for a thermal stress event at the Brazilian coast (21) and the typical temperature of *M. hispida* bleaching, respectively. After 4 days of peak temperature, the second sampling time (T1) was performed followed by the gradually decrease of temperature to 26°C (0.5°C). The last sampling time (T2) was then performed after 15 days of recovery at 26°C. A scheme of both experimental designs is shown in Supplementary Fig. S2.

Assessment of coral health parameters

The health was assessed during the experiment using morphological and algal photosynthetic parameters. The coral morphology was assessed using the Coral Health Chart (University of Queensland) (22). Corals that decreased two or more units of color between the T0 and other sampling times were considered bleached (23). Each replicate was photographed at the sampling times with a Canon T3i digital camera.

The photosynthetic efficiency of the zooxanthellae was assessed using pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry. We used a submersible diving-PAM system (Walz GmbH, Effeltrich, Germany) fitted with a red-emitting diode (LED, peak at 650 nm). To avoid non-photochemical processes of dissipation of PSII excitation energy, measurements were taken following sunset, after at least 30 minutes of darkness to ensure full photochemical dissipation of the reaction centers. The maximum quantum yield of PSII photochemistry was determined as

F_v/F_m . The diving-PAM was configured as follows: Measuring Light Intensity (MI) = 5; Saturation Pulse Intensity (SI) = 8; Saturation Pulse Width (SW) = 0,8, Gain (G) = 2; and Damping (D) = 2. Throughout the experiment the same coral fragment, from each replicate (=4 fragments), was used to measure chlorophyll fluorescence at different sampling times. The results were statistic analyzed by PAST3. Due to the fact that the results have a non-normal distribution, non-parametric Mann Whitney pairwise test followed by Kruskal Wallis test were used to compare the means analysis.

Coral DNA extractions and 16S rRNA gene amplicon sequencing

Fragments of *M. hispida* were sampled from each replicate aquarium at each sampling time and immediately cooled in liquid nitrogen and subsequently stored at ultra-freezing (-80°C) until further processing. Coral fragments were defrosted and then macerated in a mortar in dry conditions, using a pestle. Total DNA was extracted from 0.5 g of the macerated mucus/ tissue/ skeleton using the PowerBiofilm® DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.) as the manufacturer's procedures. The DNA concentration was determined using a Qubit® 2.0 Fluorometer High Sensitivity DNA Kit (Invitrogen, USA).

The V4 variable region of the 16S rRNA gene derived from all coral samples was amplified using 515F/806R primers and paired-end (2 × 250 bp) sequencing was performed at the Argonne National Laboratory (Lemont, IL, USA) using the Next Generation Sequencing Core on an Illumina Miseq, following the manufacturer's guidelines.

16S rRNA gene analysis

Samples were demultiplexed and raw sequences processed with Mothur version 1.42.1. The paired raw sequences were joined into contigs using `make.contig` command, with the parameter `bdiffs=1`. Then, sequences were screened using `screen.seqs` with the following parameter: `maxambig=0`, `maxlength=290`, `minlength=220`. Screened sequences were then aligned using a modified Silva database (passed by a virtual PCR with the same primers of the samples) as reference and the resultant alignment was submitted to `screen.seqs` and `filter.seqs` to remove sequences with bad alignment and uninformative columns of the alignment. The sequences were then pre-clustered using the command `pre.cluster` with parameter `diffs=2`. The chimeras were detected with the command `chimera.vsearch` and then eliminated. The sequences were classified using the `classify.seqs` command, with a modified Greengenes database as a reference (version released in August 2013, passed by a virtual PCR with the same primers of the samples) and a bootstrap cutoff of 80. Sequences classified into chloroplasts, mitochondria, Eukaryotes, Archaea and those not assigned to any domain were removed.

As part of quality control, one blank sample was sequenced (no biological sample added, just reagents). All sequences present in the blank sample were filtered and removed from the experimental samples. The resultant sequences were used as an input for the `dist.seqs` command. Finally, the sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs), with a cutoff of 3% of dissimilarity. All singletons were removed and to avoid bias due to sampling effort, the samples were randomly normalized to the same number of sequences (8,421 for the field experiment, 5,059 for mesocosm with sensitive corals and 3,954 for mesocosm experiment with resistant corals). The taxonomic summary was used

to understand the bacterial composition of each sample, and the OTU distribution was used to calculate the diversity and richness indexes (Shannon, Fishers' dominance and Chao), to establish the relationship between samples, and to evaluate significant differences over specific OTUs.

The statistical analyses and graphs were performed using the PAST3 program. Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) were plotted using Bray-Curtis dissimilarity of OTU distribution matrix as input with Bray-Curtis index. To assess the relationship of environmental data bacterial community, the temperature, days of experiments and F_v/F_m were assessed by the correlation coefficients between each environmental variable and the NMDS scores and presented as vectors on the ordination. Shannon index and Fishers' dominance were tested for statistical differences between them using a Two-Way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

The indicators taxa of thermal stress (sampling time) and type of coral (thermal resistant or sensitive) were found with a blocked Indicator Species Analyses using the PC-ORD program 6.0. To assess the thermal stress indicators taxa, data from both corals were used, and the type of coral was blocked. To assess the indicators taxa of each type of coral, the sampling time was blocked. We selected all OTUs with $p < 0.05$ (based on a Monte Carlo technique) and Indicator Value (IV) bigger than 60. The lowest level of taxonomy was used to classify the OTUs.

Metagenomic DNA extraction and sequencing

The effect of heatwave on the functional traits as well as the multidomain correlations in different coral phenotypes was analyzed by metagenomics.

Samples from the beginning of experiment (T0 – 26°C) and the peak of temperature (T1 – 32°C to resistant and 30.5°C to sensitive) were sequenced as described below. A pool of three DNA extraction from each biological replicate were used to increase the DNA concentration of the samples. Quality and concentration control were performed with Nanodrop absorbance and Qubit® 2.0 Fluorometer High Sensitivity DNA Kit (Invitrogen, USA), respectively. One-lane of shotgun sequencing was performed at the Argonne National Laboratory (Lemont, IL, USA) using the Next Generation Sequencing Core on an Illumina HiSeq 2500 platform.

Metagenome data processing

Metagenome analysis consisted of two parts: genome recovery and analysis on the effects of temperature shift on microbial communities. The recovery of genomes from prokaryotes, eukaryotes, viruses and *Symbiodinium* genomes was performed by employing specific approaches and tools that handle each type of microorganism. Analysis of the effects of water temperature shifts on microbial communities from prokaryotic, eukaryotic and viral origin was determined by identifying Open Reading Frames (ORFs) that were statistically significant between coral samples at normal (26°C) and high temperatures (30.5° and 32°C for thermal sensitive and thermal resistant corals, respectively).

High-throughput sequencing quality control and assembly

The raw reads obtained from whole genome shotgun sequencing were quality filtered using Trimmomatic (version 0.36 <https://github.com/timflutre/trimmomatic>), where TRAILING was set to 3, MINLEN

set to 60, HEADCROP set to 10 and all other parameters were set to default values. Assembly of quality-controlled reads was performed using two different pipelines according to the target microbial group. Identification of open reading frames (ORFs) and recovery of viral genomes was based on the contigs generated from the assembly obtained by MEGAHIT (version 1.1.3). Prokaryotic and eukaryotic genome recovery was based on the assembled scaffolds generated by IDBA-UD (<https://github.com/loneknightpy/idba>) using default parameters. The use of different assemblers was due to the better performance of the MEGAHIT assembler when compared to IDBA-UD in the recovery of viral sequences.

Identification of Open Reading Frames (ORFs) and statistical analysis

From the co-assembly of all samples using MEGAHIT, ORFs were identified with Prodigal (25). Next, the quality-controlled reads were mapped to the ORFs and those with an average coverage of at least 10 times (i.e. in average, each nucleotide of the given ORF is covered at least 10 times by one sample), were selected for further analysis. The ORFs were subsequently mapped to each generated bin (including all taxonomic domains) by aligning their sequences to the scaffolds within each bin using Bowtie2 (26). Finally, the number of ORFs that were mapped to each bin and host genome was calculated using SAMtools (27).

Analysis on the effects of pulse heat stress on microbial communities including prokaryotes, eukaryotes and viruses were determined by identification of ORFs that were statistically significant among samples. We considered statistically significant as those showing $P < 0.05$ between groups of samples

using least square means method (Lenth 2016) with False Discovery Rate (FDR) for multiple correction testing (“lsmeans” R package). Samples were grouped by coral phenotype (“sensitive T0” - sensitive coral samples collected at the beginning of the experiment incubated at 26°C; “sensitive T1” - sensitive coral samples collected after temperature peaked at 30.5°C); “resistant T0” - resistant coral samples collected at the beginning of the experiment incubated at 26°C; and “resistant T1” - resistant coral samples collected after temperature peaked at 32°C).

Functional annotation of the identified ORFs was performed by searching the Swissprot section of the Uniprot database (UniProt, 2015) using BLAST v2.2.30. For every predicted ORF, the match with the highest bitscore was used for the putative annotation if it had an e-value $>1e-5$. In addition, functional annotation of ORF was also performed by GhostKOALA (28). In brief, this web-based tool performs an automatic annotation of the ORFs and assigns KEGG Orthology (KO) identifiers, which can be used to predict individual ortholog functions as well as KEGG pathway and module reconstructions. It is possible that positive assignment of a KO identifier to a given ORF will not be mapped to a module or pathway due to the absence of information in the database (28).

We calculated the percentage of Eukaryotes and Prokaryotes in the different metagenomic libraries as follows. The raw reads of each library were quality checked and assembled using IDBA-UD (Eukaryotes and Prokaryotes) and MEGAHIT (viruses) as described earlier. EukRep, a pipeline developed for the recovery of eukaryotic bins (29), was used to separate the scaffolds into prokaryotic scaffolds and eukaryotic scaffolds. VirSorter (30) and VirFinder (31) were used to determine viral contigs. In addition, the identification of predominant

Symbiodiniaceae lineages within the obtained metagenome data was performed by identifying SSU sequences using Emirge (30) and assigning taxonomy to these sequences using the SILVA database (<https://www.arb-silva.de/>). For identified Symbiodiniaceae genus previously generated genome assemblies were downloaded from NCBI database.

The proportion of Eukaryotes, Prokaryotes and viruses in each library was determined in two steps. Quality checked reads were first assembled with pandaseq (32) and secondly mapped to the corresponding scaffolds (Eukaryotes and Prokaryotes) and contigs (viruses). The number of reads mapped to Eukaryotes, Prokaryotes (scaffolds) and viruses (contigs) was calculated using samtools. The Venn diagrams were generated using an in-house R script. The number of reads mapped were calculated with samtools and the percentages of mapped reads as part of total reads were calculated using Libreoffice-calc. Further, we determined if statistically significant ORFs were of mitochondrial origin. Thus, we selected the contigs containing statistically significant ORFs. After, this pool of contigs was blasted against the database of mitochondrial sequences from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/contam/>). All alignments with an e-value < 0.001 were considered significant.

Heatmaps were generated with the heatmap.2 function (gplots v3.0.1.1 R package) using the normalized relative abundance of ORFs. Normalization was performed using the scale function (R base) without centering.

Recovery of bins

After assembly, prokaryotic bins were recovered using the DAS tool (39), using parameters indicated by the developers. The binning methods used in this approach comprised of ABAWACA (<https://github.com/CK7/abawaca>),

CONCOCT (40), MaxBin2 (41) and MetaBAT (42). Quality assessment, including completeness and contamination estimation, of the generated bins was performed with CheckM ("lineage_wf" function) (43). Recovery of 16S rRNA sequences was achieved by CheckM SSU Finder (43) using default parameters. Eukaryotic bins were recovered using the EukRep pipeline according to developer's instructions (35). Briefly, this pipeline separates the scaffolds assembled with IDBA-UD into eukaryotic or prokaryotic by employing a support vector machine learning algorithm trained with genomes downloaded from NCBI and JGI. Next, the eukaryotic scaffolds were binned using CONCOCT. Bins with a size smaller than 2.5 Mbp were removed. Quality assessment of the eukaryotic bins was determined using BUSCO (44) according to the instructions of the developers. Taxonomic assignment of the generated bins was performed by taxator-tk (45).

The contigs from which viral sequences could be recovered were processed as follows. First, contigs identified as VirSorter categories 1 and 2, as well as contigs with a VirFinder p-value < 0.01 were retained for further analysis. These significant viral contigs were then clustered per dataset at 95% nucleotide (nt) identity using VSEARCH to remove redundancy. Contigs < 1,000 nt were removed. For taxonomic assignment, viral ORF amino acid sequences were aligned to a viral RefSeq protein database (February 2019) using DELTA-BLAST (46) with an e-value cut off of 10^{-3} . If more than one ORF per contig was present after alignment, we then chose the representative ORF showing the lowest e-value and highest bit score. Viral taxonomy assignments were calculated for all representative ORFs.

Funding

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ). JPS, RBT and UNR were supported by the Helmholtz Association (Germany) through the Young Investigator Group [VH-NG-1248].

Competing Financial Interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgment

We thank the Graduate Programs of Science (Microbiology) and Vegetal Biotechnology and Bioprocess Engineering (PBV)/Federal University of Rio de Janeiro, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) for their support.

References

1. Hughes, T. P., et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*. 2018; 83: 80–83.
2. Palumbi, S. R., Barshis, D. J., Traylor-Knowles, N., Bay, R. A.. Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science*. 2014; 344: 895-898.
3. Le Nohaïc, M., et al. Marine heatwave causes unprecedented regional mass bleaching of thermally resistant corals in northwestern Australia. *Scientific reports*. 2017; 7: 14999.
4. Camp, E. F., Schoepf, V., Suggett, D. J. How can “Super Corals” facilitate global coral reef survival under rapid environmental and climatic change? *Global change biology*. 2018; 24: 2755-2757.
5. Robbins, S. J., et al. A genomic view of the reef-building coral *Porites lutea* and its microbial symbionts. *Nat microbiology*. 2019; 4: 2090–2100.
6. Peixoto, R. S., Rosado, P. M., Leite, D. C. de A., Rosado, A. S., Bourne, D. G. Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 1–16.
7. NASEM. *A Research Review of Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs*. (National Academies Press, 2018).
8. Ainsworth, T. D., Thurber, R. V., Gates, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol. Evol*. 2010; 25: 233–240.
9. Ziegler, M., Seneca, F. O., Yum, L. K., Palumbi, S. R., Voolstra, C. R. Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. *Nat commun*. 2017; 8: 14213.
10. Littman, R., Willis, B. L., Bourne, D. G. Metagenomic analysis of the coral

- holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011; 3: 651–660.
11. Wangpraseurt, D., et al. In vivo Microscale Measurements of Light and Photosynthesis during Coral Bleaching: Evidence for the Optical Feedback Loop ? *Frontiers in microbiology.* 2017; 8: 59.
 12. Takahashi, S., Nakamura, T., Sakamizu, M., Woesik, R. V., Yamasaki, H. Repair Machinery of Symbiotic Photosynthesis as the Primary Target of Heat Stress for Reef-Building Corals. *Plant and Cell Physiology.* 2004; 45: 251–255.
 13. Lesser, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 2006; 68: 253–278.
 14. Levin, R. A., et al. Sex, Scavengers, and Chaperones: Transcriptome Secrets of Divergent Symbiodinium Thermal Tolerances. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33: 2201–2215.
 15. Fellous, A., Favrel, P., Riviere, G. Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Genomics.* 2015; 19: 23–30.
 16. Oakley, C. A., Davy, S. K. *Cell Biology of Coral Bleaching. In: Coral Bleaching.* (Springer, Cham, 2018)
 17. Weis, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 2008; 211: 3059–3066.
 18. Dunn, S. R., Pernice, M., Green, K., Hoegh-guldberg, O., Dove, S. G. Thermal Stress Promotes Host Mitochondrial Degradation in Symbiotic Cnidarians : Are the Batteries of the Reef Going to Run Out ? *PLoS One.*

- 2012; 7: 7.
19. Hoogenboom, M. O., Anthony, K. R. N., Connolly, S. R. Energetic cost of photoinhibition in corals. *Marine Ecology Progress Series*. 2006; 313: 1–1
 20. Zaneveld, J. R., McMinds, R., Thurber, R. V. Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat. Microbiol.* 2017; 2: 17121.
 21. Soares, M. de O. & Rabelo, E. F. Primeiro registro de branqueamento de corais no litoral do Ceará (NE, Brasil): Indicador das mudanças climáticas? *Geociencias*. 2014; 33: 1–1.
 22. Siebeck, U. E., Marshall, N. J., Klüter, A., Hoegh-Guldberg, O. Monitoring coral bleaching using a colour reference card. *Coral Reefs*. 2006; 25: 453–460.
 23. Horvath, K. M., et al. Next-century ocean acidification and warming both reduce calcification rate, but only acidification alters skeletal morphology of reef-building coral *Siderastrea siderea*. *Sci. Rep.* 2016; 6: 29613.
 24. Miller, C. S., Baker, B. J., Thomas, B. C., Singer, S. W., Banfield, J. F. EMIRGE : reconstruction of full-length ribosomal genes from microbial community short read sequencing data. *Genome Biology*. 2011; 12: 2-14.
 25. Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., Hauser, L. J. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 119.
 26. Langmead, B., Steven L. S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012; 9: 357.
 27. Li, H., et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25: 2078-2079.

28. Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of molecular biology*. 2016; 428: 726–731.
29. West, P. T., Probst, A. J., Grigoriev, I. V, Thomas, B. C., Banfield, J. F. Genome-reconstruction for eukaryotes from complex natural microbial communities. *Genome research*. 2018; 28: 569-580.
30. Roux, S., Enault, F., Hurwitz, B. L., Sullivan, M. B. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ*. 2015; 3: 2015.
31. Ren, J., Ahlgren, N. A., Lu, Y. Y., Fuhrman, J. A., Sun, F. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome*. 2017; 5: 69.
32. Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G., Neufeld, J. D. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC bioinformatics*. 2012; 13: 31.
33. SIEBER, CHRISTIAN. (2017, March 1). Dereplication, Aggregation and Scoring Tool (DAS Tool) v1.0 (Version 00) [Computer software]. <https://www.osti.gov//servlets/purl/1345357>.
34. Alneberg, J., et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature methods*. 2014; 11: 1144–1146.
35. Wu, Y., Simmons, B. A., & Singer, S. W. MaxBin 2 . 0 : an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics Advance*. 1–2 (2015).
36. Kang, D. D., Froula, J., Egan, R., Wang, Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*. 2015; 3: 1165.

37. Parks, D. H., et al. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature microbiology*. 2017; 2: 1533.
38. Waterhouse, R. M., et al. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Molecular biology and evolution*. 2017; 35: 543-548.
39. Dröge, J., Gregor I., McHardy, A. C. Taxator-tk: precise taxonomic assignment of metagenomes by fast approximation of evolutionary neighborhoods. *Bioinformatics*. 2014; 31: 817-824.
40. Boratyn, G. M., Schäffer, A. A., Agarwala, R., Altschul, S. F., Lipman, D. J., Madden, T. L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biology direct*. 2012; 7: 12.

Figures

Fig. 1: Differences in the microbial communities among resistant and sensitive corals in the field during (F1) and after (F2) a bleaching event. Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) (A), relative abundance of order taxonomy (B) level and diversity indexes.

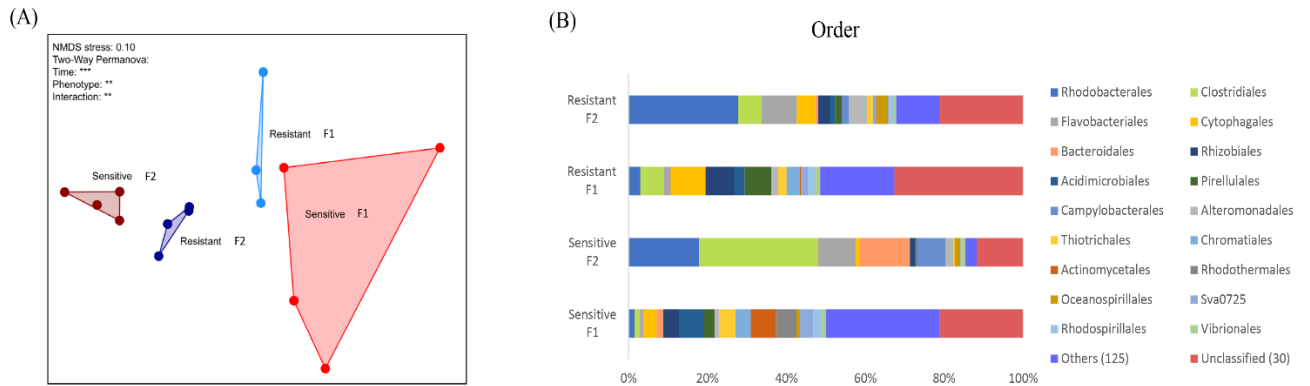


Fig. 2: F_v/F_m values from Sensitive (A) and Resistant (D) corals along the temperature experiment in mesocosms. Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) showing the dynamic of beta diversity microbiome from TS (B) TR corals (E) and relative abundance of order taxonomy level of TS (C) and TR corals (F).

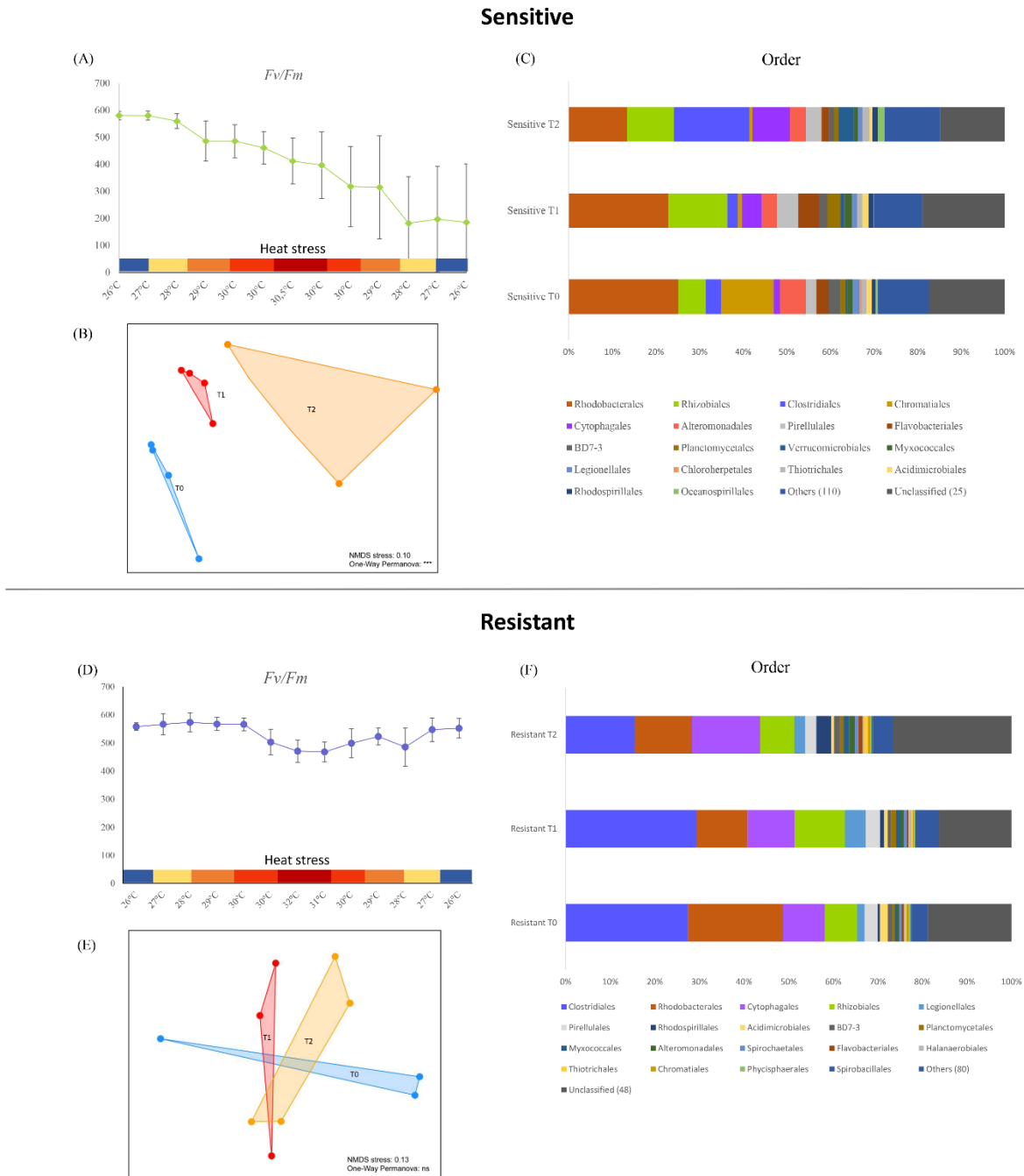
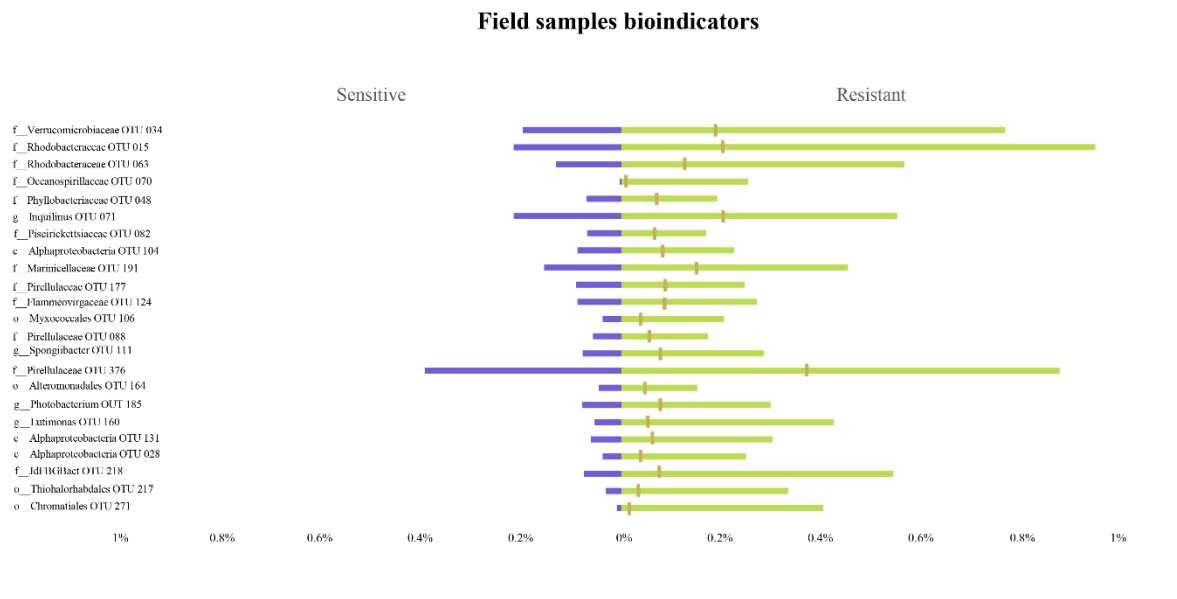


Fig. 3: Bacterial indicators taxa of corals phenotypes in the field samples and pulse thermal stress in mesocosm experiment. OTUs are pointed out with the lowest taxonomic level found, where "f" corresponds to the family, "p" phylum and "g" genus. The horizontal bars show that there is a statistical difference between the indicated times and their p values. Bars express the percent average of the OTU and the gold bars the difference between coral phenotypes.



Microcosm experiments bioindicators

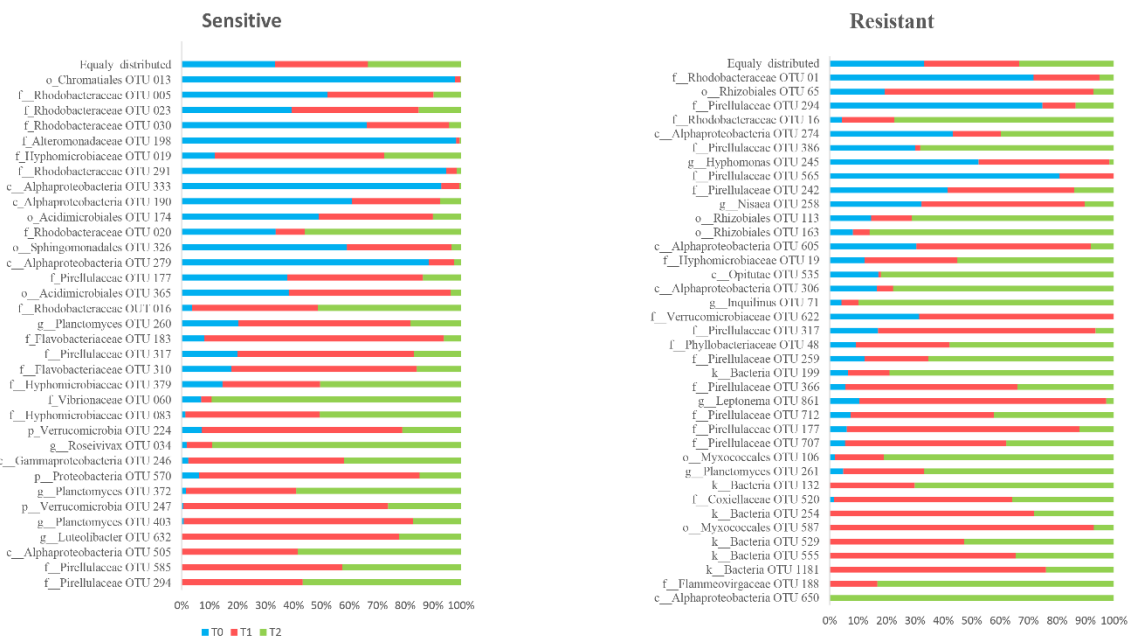


Fig. 4: Distribution of significant ORFs within different groups (Viruses, Eukaryotes and Prokaryotes) in a Venn Diagram. Pizza charts around the Venn-Diagram indicate the distribution of the annotated ORFs within each group, where functions correlated with T0, T1 or both are presented in blue or red, respectively.

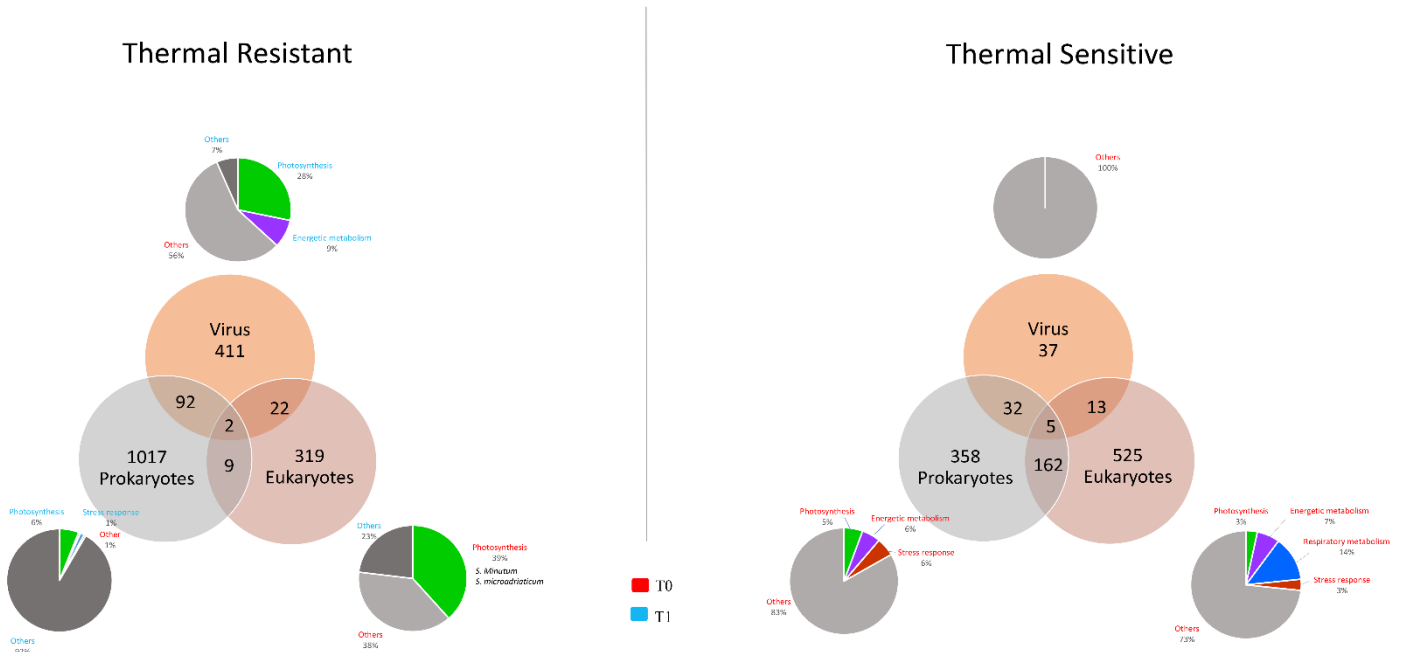
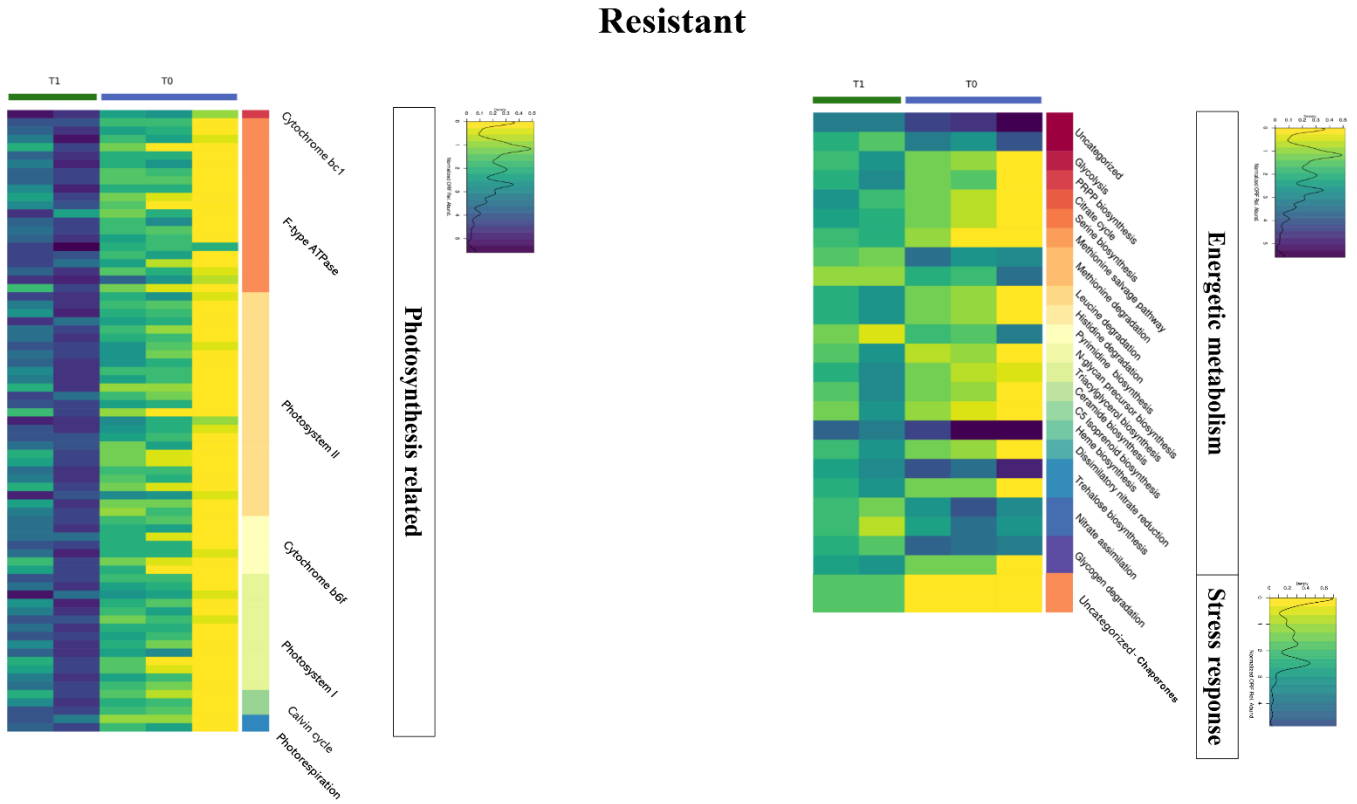


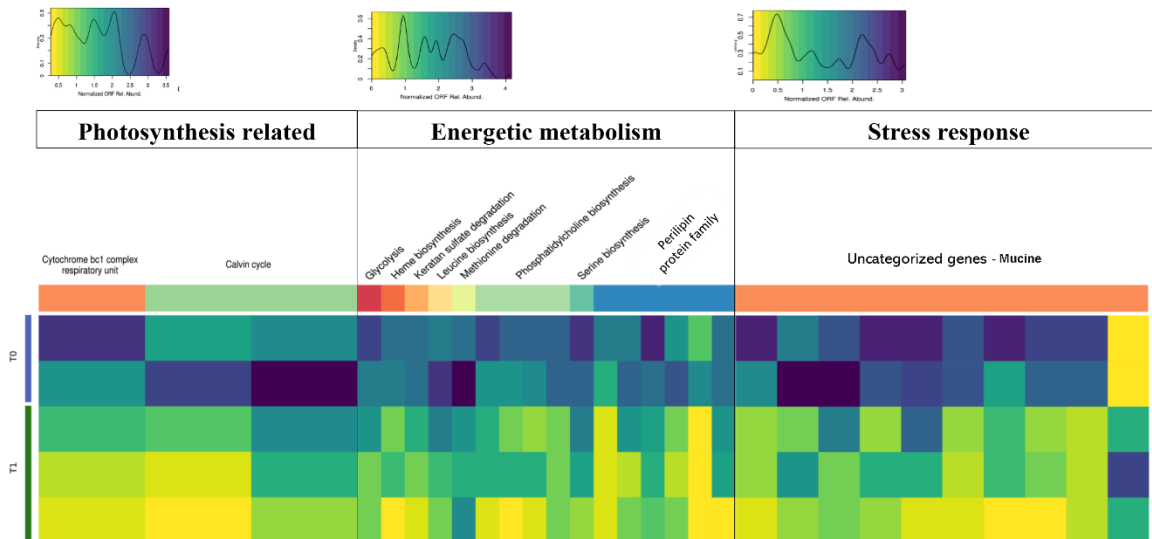
Fig. 5: Heatmap with mean significant open reading frames (ORFs) associated with TR (A) and TS (B).

A)



B)

Sensitive



5.2. Capítulo II

CORAL MICROBIOME MANIPULATION ELICITS METABOLIC AND GENETIC RESTRUCTURING TO MITIGATE HEAT STRESS AND EVADE MORTALITY

SANTORO, E. P.¹; BORGES, R. M.²; ESPINOZA, J. L.³; FREIRE, M.^{3,4}; MESSIAS, C. S. M. A.¹; VILLELA, H. M. D.¹ ; MATTOS, L. P.¹; VILELA, C. L. S.¹; ROSADO, J. G.¹; CARDOSO, P. M.¹; ROSADO, P. M.¹; ASSIS, J. M.¹; DUARTE, G. A. S.^{1,5}; PERNA, G.^{6,7} ; ROSADO, A. S.¹; MACRAE, A.¹; DUPONT, C. L.³; NELSON, K.E.³; SWEET, M. J.⁸; VOOLSTRA, C. R.^{6,7}; PEIXOTO, R. S.^{1,5,7*}

¹ Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

² Walter Mors Institute of Research on Natural Products, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

³Department of Genomic Medicine and Infectious Diseases, J. Craig Venter Institute, La Jolla, CA, U.S.A.

⁴Department of Infectious Diseases and Global Health, School of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA, U.S.A.

⁵IMAM-AquaRio – Rio de Janeiro Aquarium Research Center, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Department of Biology, University of Konstanz, Konstanz 78457, Germany

⁷Red Sea Research Center (RSRC), Division of Biological and Environmental Science and Engineering (BESE), King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Saudi Arabia

⁸ Aquatic Research Facility, Environmental Sustainability Research Centre, University of Derby, UK

*Corresponding author

Phone: 55 21 2562-6740

e-mail: raquel.peixoto@kaust.edu.sa

Red Sea Research Center, 4700 King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Building 2, Thuwal, 23955-6900, Saudi Arabia.

ABSTRACT (Limit: 150 words):

Beneficial Microorganisms for Corals (BMC) ameliorate environmental stress, but whether they can prevent coral mortality and the underlying mechanisms remain elusive. To address these questions, we conducted a suite of -omics analyses on fragments of the coral *Mussismilia hispida* exposed to bleaching conditions in a long-term mesocosm experiment, either inoculated with a selected BMC consortium or a saline solution placebo. BMC treatment increased coral survival rates by 40% concomitant with stable photosynthetic performance by the endosymbiotic algae. Thermal tolerance and survival of BMC-treated fragments was signified by patterns of DMSP degradation, lipid reservoir maintenance, and shifts in the expression of prominent immune and stress markers of the coral host. Most notably, we found down-regulation of kinase activity that controls the apoptosis cascade in BMC-treated corals. Our work provides first insights into the mechanisms that underlie probiotic host manipulation. We demonstrate that BMC exposure triggers a dynamic microbiome restructuring process that instigates changes in the coral host evidenced by genetic and metabolic alterations that eventually mitigate coral bleaching and mortality.

Keywords: Beneficial Microorganisms for Corals, coral bleaching, thermal stress, marine probiotics, Immune Networks, function, metabolomics, metatranscriptomics.

Introduction

Coral reefs have been undergoing unprecedented mass coral bleaching events over recent decades fueled by ocean warming (1) heightening the need to devise effective countermeasures to mitigate further decline (2, 3). Increasing sea surface temperatures (SST) trigger the disruption of the symbiotic relationship between the coral host and its endosymbiotic algae of the family Symbiodiniaceae (4) resulting in the physical whitening of coral colonies known as “bleaching”. Photosynthetic products from the endosymbiont algae cover over 90% of the host’s nutritional demands (5). Thus, prolonged periods of bleaching lead to coral mortality.

Besides endosymbiotic algae, corals are associated with a suite of other organisms (bacteria, protists, fungi, viruses, etc.), collectively referred to as the coral holobiont or metaorganism (6 - 9). In particular, bacteria are assumed to contribute to coral holobiont biology, notably stress tolerance and adaptation to disparate environments (9-14). The importance of bacteria led to the proposal of the coral probiotic hypothesis (15), which states that microbes support coral biology through selection of the most advantageous holobiont configuration in a given environment. It was later refined by the microbiome flexibility hypothesis to include the notion that the potential or propensity for microbiome change differs between host species (14). The proposal to employ these facets for the selection and manipulation of specific microbes to aid coral metaorganism stress tolerance and resilience was dubbed ‘Beneficial Microorganisms for Corals’ (BMCs) (9). Beneficial microorganisms putatively act in nitrogen fixation, sulfur cycling, scavenging reactive oxygen species (ROS), and production of antibiotics to thwart pathogens, for example (9, 10, 16).

The proof-of-concept that manipulating coral microbes improves coral stress tolerance was recently demonstrated in the first experiments to identify the beneficial nature of a select BMC consortium in ameliorating coral bleaching (17). Nevertheless, exactly “how” these BMCs were associated with functional changes in the host remained unknown. In addition, although the ability of BMCs to ameliorate coral bleaching has been demonstrated (17), it is unknown whether they have the capacity to help corals evade mortality, e.g. through the provisioning of alternate metabolites to compensate the loss of Symbiodiniaceae. Despite the diversity of the coral microbiome, which makes deciphering the contribution of associated microbes to coral holobiont biology challenging, the dynamic nature of the coral microbiome, which can often change dramatically - e.g., across sites, species, age, and under stress - further complicates the ability to conduct such studies in the natural environment (18-20, 14). For this reason, manipulation of BMCs in controlled experimental setups, such as mesocosms (21), provides an avenue to identify important microbial players and study the underlying mechanisms while maintaining a quasi-reef environment, to improve and inform the development of biotechnological solutions to promote coral reef resilience.

Here, we employed coral mesocosms in combination with multi-omics evaluation to decipher the mechanisms that underlie the increased stress tolerance and coral mortality evasion offered by the provisioning of probiotics. In a large-scale effort, fragments of the coral *Mussismilia hispida* were exposed to thermal stress in a 75-day mesocosm experiment and inoculated with either a *M. hispida*-tailored BMC consortium or, alternatively, a saline solution placebo. Coral health (measured via F_v/F_m rates and survivorship), microbial activity, and functional responses were assessed through a multi-

omics approach. Our analysis shows that increased stress tolerance and survivorship of coral holobionts exposed to a BMC consortium coincided with holobiont restructuring and a defined coral host gene expression re-programming targeting metabolic and immune pathways under acute thermal stress and the subsequent recovery period.

Results

BMC-consortium selection, assembly, and experimental setup

Bacterial strains were isolated from a visually healthy colony of *M. hispida*. The consortium was assembled with bacterial strains exhibiting : 1) at least one of the beneficial identified traits detailed below; 2) absence of antagonist activity against other selected BMCs; and 3) no previous record of the species/strain being harmful to humans or other marine life. Beneficial traits included nitrogen fixation (*nifH*), nitrification (*nirK*), DMSP-degradation (*dmdA*), reactive oxygen species scavenging potential (measured through catalase activity), and antagonistic activity against two coral-pathogens, *Vibrio coralliilyticus* strain V1 and *Vibrio alginolyticus* V2 (22, 23).

From an initial 133 obtained strains (Supplementary Table 1), the assembled BMC consortium was composed of the following six bacteria: *Bacillus lehensis* (M20) positive for *nifH*, *nirK* and *dmdA*; *Bacillus oshimensis* (M24) positive for *dmdA*; *Bacillus lehensis* (M3) positive for *nifH* and *dmdA*; *Brachybacterium conglomeratum* (M1) positive for catalase and *nifH*; *Planococcus rifietoensis* (CM29) presenting antagonistic activity against V1 and *Salinivibrio* sp. (F2) presenting antagonistic activity against V1 and V2. The experimental BMC assembly consisted of lag-phase grown strains collected and re-suspended in sterile saline solution (0.85% NaCl) at 1×10^8 cells per mL (for details see

Supplementary Figure 1). The placebo/control consisted of a sterile saline solution (0.85% NaCl), hereafter referred to as the placebo treatment.

BMCs and placebos were applied every three days during a simulated heat stress event (maximum temperature 30°C) and every five days for the remainder of the 75-day mesocosm experiment (Figure 1-A), while an ambient control was run in parallel (26°C). We focused on four time points, T0 at the beginning of the experiment, T1 upon reaching peak temperature in the heat stress (30°C), T2 at the end of peak temperature heat stress (30 °C), and T3 following a 15-day recovery period at 26°C. Microbiome changes associated with BMC treatment were investigated through 16S rDNA metabarcoding (T0, T1, T2, T3). In addition, patterns and mechanisms underpinning the projected increased stress tolerance provided by the BMC treatment were assessed through the evaluation of coral physiology (visual monitoring of bleaching and photosynthetic efficiency of Symbiodiniaceae for T0, T1, T2, T3), elucidation of metabolic footprints (Nuclear Magnetic Resonance (NMR)/PLS-DA at T0, T1, T2, T3), and determination of coral transcriptome patterns at the end of the experiment (T3) (See Figure 1-A).

Host-microbiome shift associated with BMC treatment during heat stress

In order to confirm the presence of the BMC consortium members in the coral microbiome, the 16S rDNA sequence of each of the six BMC members was used to query ASVs from both BMC and placebo-treated fragments. We identified three of the six strains throughout various time points of the experiment: CM29 *P. rifietoensis* (T1 BMC-treated), M24 *B. oshimensis* (T1, T2 BMC-treated), and M1 *B. conglomeratum* (T2 BMC-treated) (Figure 2-A).

Parallel to the confirmed incorporation of three of the BMC strains in T1 (CM29 and M24) and T2 (M1 and M24) (Figure 2-A), the overall bacterial community structure of BMC-treated corals was significantly different from placebo-treated corals during the heat stress (T2) (PERMANOVA, $p = 0.05$), but became indiscernible during the recovery period (T3) ($p=0.583$, stress=0.15) (Supplementary Figure 2), where BMC strains were also not detected. The most abundant bacterial phyla identified across corals were Proteobacteria, followed by Bacteroidetes, throughout the course of the experiment (Supplementary Figure 3). Despite such consistency at higher taxonomic levels, we found variability over time with regard to bacterial taxa association. Although the most relatively abundant genera associated with corals at T0 were consistently *Ruegeria* (11.9%), *Tistlia* (4.6%), and *Candidatus Amoebophilus* (4.2%), we only found *Ruegeria* species to be abundant across BMC-inoculated corals (T1: 15.1%, T2: 13.4%, T3: 17.3%), while in placebo-treated coral fragments, *Paramaledivibacter* spp. were the most prevalent (T1: 21.6%, T2: 13.8%, T3: 3.9%). Additionally, ASVs exhibiting significant differential abundance were identified in BMC-treated fragments under thermal stress when compared to placebo samples (Figure 2-B). Overall, 13 ASVs were significantly increased (average \log_2 fold-change = 22.4 $p < 0.01$) in BMC-treated samples in T1, 23 ASVs in T2 (average \log_2 fold-change = 21.8 $p < 0.01$), and 18 ASVs in T3 average \log_2 fold-change = 21.7, $p < 0.01$ (Figure 2-A), corroborating that provisioning of BMCs affect microbiome structure beyond the addition of selected strains. and *Ruegeria* (\log_2 fold-change 15.3) was confirmed as one of the BMC-enriched bacterial groups, specially in T2 (Figura 2-A). Despite the observed microbiome structure changes, overall community diversity of BMC- and placebo-treated remained similar throughout the course of the experiment

(given by Shannon, Chao1 and ASV distribution indexes - ANOVA, $p=0.8$) (Supplementary Figure 4).

BMC treatment contributes to increased survivorship and recovery from bleaching after acute thermal stress

We compared photosynthetic efficiency and coral holobiont survival to assess the BMC treatment effect. Most notably, survivorship of corals inoculated with the BMC-consortium was substantially higher, with 100% of fragments surviving the heat stress treatment (T3) compared to only 60% of the placebo-treated corals (Figure 1-C; for coral visual morphology see Supplementary Figure 5). Importantly, surviving corals in the placebo-treated regime showed a significant decrease in the F_v/F_m average rates (65% decrease, from T0 to T3 $p < 0.05$) at the end of the experiment compared to the beginning (Figure 1-B), while photosynthetic efficiencies of BMC-treated corals only briefly decreased at the peak of temperature stress (T2) ($p < 0.05$) and quickly returned to the initial average during the recovery period (T3) ($p = 0.197$).

Transcriptional reprogramming of stress, metabolic, and immune genes of BMC-treated coral holobionts under heat stress

We were further interested to elucidate the coral host transcriptomic response associated with the observed increase in thermal tolerance. RNA-Seq was conducted on samples from BMC- and placebo-treated coral fragments at the end of the experiment (T3, $n = 20$ samples). Coral genes were assorted into orthogroups to increase confidence in annotation, and hence, functional inference. To elucidate the transcriptomic footprint

induced by heat stress, we considered orthogroups showing a significant difference (FDR $p < 0.01$) between “placebo 30 °C × placebo 26 °C” considering KEGG pathway annotations. Those were then used as the baseline to compare up- or down-regulation induced by the BMC treatment during heat stress. Heat stress significantly increased the expression of orthogroups involved with the regulation of immune and metabolic pathways, the cell cycle, membrane transport, the apoptosis cascade, and stress response (See placebo 30 °C × placebo 26 °C comparison in Figure 3). Notably, most of these orthogroups were down-regulated by the BMC treatment in both the ambient (26 °C) and high-temperature (30 °C) regimes. Interestingly, BMCs seemed to exert an overall suppressive effect of host gene expression, since most of the orthogroups up-regulated as a host response to thermal stress in the placebo-treatment were down-regulated in the BMC treatment (Figure 3). For example, orthogroups related to sugar metabolic pathways, which exhibited increased expression under heat stress, were down-regulated in the BMC treated corals ($\log_{2}FC = -1.95$ and -1.72 , respectively). Similarly, an orthogroup associated with biosynthesis of unsaturated fatty acids that was up-regulated during heat stress in the placebo samples ($\log_{2}FC = 1.16$), was down-regulated in BMC samples ($\log_{2}FC = -3.18$). The general down-regulation of metabolic genes in BMC treated corals was further corroborated by the down-regulation of amino-acid pathways (e.g., lysine degradation; taurine, glycine, serine, threonine, cysteine, methionine and hypotaurine metabolism; valine, leucine and isoleucine biosynthesis). In the same way, metabolic enzymes, directly involved in triggering apoptosis, such as glutamate 5-kinase ($\log_{2}FC = 1.66$) and creatine kinase B-type ($\log_{2}FC = 1.32$) were down-regulated by BMCs under heat stress, in comparison to the placebo-treated corals. Further, other kinases,

such as casein kinase I isoform alpha (FC= -0.82, FDR=1), calcium-dependent protein kinase 1 (logFC= -1.75) and 2 (logFC= -0.79), CDPK-related kinase 1 (logFC= -1.80), and serine/threonine-protein kinase ppk15 (logFC= -2.10) were down-regulated in BMC-treated corals under heat stress. Besides the transcriptional reprogramming of metabolic genes, we found innate immune system genes to be differentially expressed. Most notably, the orthogroup mapping to pectin acetyltransferase 7-like that is part of the immune Wnt signaling pathway which controls the early innate immune response, evaded heat-stress upregulation in the BMC-treatment samples (FC=-4.65) (Figure 4). In addition, master immune genes such as NLRP3 inflammasomes were also down-regulated after BMC-induction. These results indicate that networks of genes linking immunometabolism were significantly modulated by BMC inoculation and the subsequent microbiome restructuring in response to stress.

Besides the analysis of differentially expressed orthogroups, we were interested to investigate the role of BMCs in processes associated with oxidative and thermal stress, as well as with DNA repair. For this reason, we determined the response of orthogroups related to these functions in the metatranscriptome, irrespective of the gene expression significance level applied. Five orthogroups encoding catalase, 15 orthogroups encoding cytochrome p450 (logFCs between 0.07 and 1.51, FDR=1), and 16 orthogroups that are part of the peroxisome pathway (logFCs between 0.006 and 1.16, FDR=1) were found to be up-regulated in the BMC-treated samples exposed to heat stress (Supplementary Table 4). In addition, chaperones, heat-shock proteins, ATP-dependent Hsl protease ATP-binding subunit HslU, and five tight-junction proteins were found up-regulated in BMC-treated fragments under thermal stress (Supplementary Table 2). Similarly, DNA

repair was up-regulated in BMC-treated corals under heat stress, as shown by the increased expression of orthogroups belonging to nucleotide excision repair, base excision repair, and mismatch repair.

Taken together, we found that inoculation with BMCs instigated restructuring of the transcriptional network, with downregulation of orthogroups associated with sugar metabolism, amino acid metabolism, apoptosis, and the immune response, and upregulation of genes that counter oxidative and thermal stress. Importantly, the proximate cause of the transcriptional reprogramming was the BMC-treatment that resulted in a host restructured microbiome, which in turn suggests a signal cascade from the microbes to the coral host, corroborating the notion that the holobiont is the functional biological unit.

Metabolic restructuring of BMC-treated coral holobionts under heat stress

We obtained metabolic profiles from the thermal stress experiment using NMR to identify metabolic mechanisms associated with the microbial and genomic restructuring underpinning the increased thermal tolerance of BMC-treated corals. Sample complexity led to strong overlapping ^1H resonances, challenging the elucidation of metabolic patterns. Nevertheless, the characterized peaks at 2.88 ppm (singlet from the S-Methyl groups) for DMSP and at 2.58 ppm (singlet from the S-Methyl groups) for DMSO were found to be separated and well-defined, as well as correlated with different treatments (Figure 4-B). DMSP variation was found to be positively correlated to the BMC-treated corals, and DMSO variation was found to show a negative correlation to the BMC-treated corals in the PLS-DA loading plot (Figure 4-B). To explore the correlations in more detail, comparing metabolic variations overtime (i.e., T1, T2, and T3), the area under the curve

representing the direct quantitative ratio for the selected DMSP and DMSO peaks was integrated and represented as boxplots, which indicated significant decreases in the DMSP and DMSO levels observed at T2 and T3 in BMC-treated samples exposed to thermal stress ($p < 0.05$, Figure 4-C for DMSP and 4-D for DMSO). We therefore used both, DMSP and DMSO, as important proxies for the metabolic assessment because of their clear separation from overlapped profiles, as well as due to their importance in sulfur cycling and microbial structuring (i.e., role of DMSP-related chemotaxis of *Vibrio coralliilyticus* and antimicrobial activity of DMSO). In addition, lipids, despite their predominance presence in every sample, were also positively correlated to the BMC-treated corals as indicated by the PLS-DA loading plot (Figure 4-B). Nevertheless, the strong overlapping signals (at ~5.26, ~2.74, 1.19, and 0.87 ppm) prevented the possibility of annotating specific compounds.

Discussion

The promise of coral probiotics to increase stress tolerance of corals has only been very recently shown (10, 17, 24), but the effect BMCs exert on the holobiont or whether BMCs can increase survivability of corals under stress remains elusive. Here we show that the inoculation of coral fragments with a native BMC consortium instigated holobiont changes at the level of the microbiome, host gene expression, and metabolism, that coincide with an increase in coral survival rates. As such, our results provide a first insight into the mechanistic underpinnings of how BMCs potentially exert their effect, although the detailed functional changes that cause the altered phenotype await further elucidation. Taken together, our results argue for an integrated protection of the metaorganism by the

BMC consortium, as indicated by changes at the host, Symbiodiniaceae, and bacterial compartment level.

From the results obtained, , the following key findings emerge: First, the major changes in the microbial community during the heat stress, commonly observed in corals (25, 11, 26), in connection to the dynamic restructuring of this microbiome after the recovery period, indicate that *M. hispida* may fit into the “microbiome conformer” flexibility type suggested by Ziegler et al., (13) and Voolstra and Ziegler (14). This term applies to corals that exhibit bacterial community reconfiguration upon a stress. Following this notion, the level of microbiome flexibility may be considered as a factor to identify corals with high(er) manipulative potential. Corals that naturally alter their microbial composition and potentially uptake new members from the environment are more likely to accept inoculants (14, 27). Notably, shifts in metaorganism microbial composition are, potentially, a rapid and versatile means of adaptation to environmental change (12 -14).

Notably, the host’s ability to take up microorganisms from the environment is hypothesized to increase when under stress, a conclusion based on the finding that many host microbiomes appear less ordered when stressed (13, 20, 28). Inoculation of high numbers of different BMC cells (i.e., a consortium) may therefore ensure uptake of at least some microorganisms exhibiting beneficial characteristics, which may at the same time preclude colonization by pathogens considering that ‘space is limited’. Notably, the use of bacterial consortia provides a combination of beneficial mechanisms to increase stress tolerance, even if not all members of the BMC successfully associate with the coral holobiont (17, 25, 29 – 31). Here we show that the use of a bacterial consortium assured incorporation of some of the selected BMCs to the coral microbiome, which were found

in the microbiome of BMC treated corals during the thermal stress, i.e., at T1 and T2 (see Figure 2-A). Notably, members of the BMC consortium were not detected after the 15-day stable condition period (T3, i.e., recovery). This suggests three things: first, a dynamic restructuring of the microbiome can happen on a relatively small time scale (11, 13, 32), second, incorporation of BMCs might be facilitated under stress (in this experiment: during the peak of temperature) because coral defense is compromised or selection for beneficial microbes is supported, and third, that it is currently unclear how long the beneficial effect of BMCs is lasting. From our results, it appears that BMC members colonized coral fragments during stress and instigated significant changes in the coral holobiont, but reverted to the original microbiome structure after ceasing of stress (sensu Ziegler et al. (13) who used the term 'microbiome recovery'). Accordingly, the duration of the presence of the stressor might determine the longevity of the BMC effect, respectively repeated addition of BMCs might be needed to ensure a long-lasting effect under natural conditions (10).

The early and detectable incorporation of some of the BMC-consortium members into the coral microbiome and the consequent microbial restructuring were correlated with significant improvements in the coral response to thermal stress, as most convincingly demonstrated by mortality evasion. Heat stress-driven mortality and/or decrease in F_v/F_m rates observed in fragments that were not treated with BMCs, suggest damage to the temperature-related photosystem II electron transport of the Symbiodiniaceae through chronic photoinhibition (33), which ultimately leads to a breakdown in symbiosis and results in loss/expelling of the Symbiodiniaceae, i.e. bleaching (34). Notably, bleaching is a symptomatic process, i.e. loss of Symbiodiniaceae can occur through multiple

processes, including host cellular apoptosis (35) or necrosis, and eventually death from starvation (36), which was corroborated by the up-regulation of different enzymes and kinases directly involved in triggering apoptosis in heat-stressed corals (37, 38). Importantly, this apoptosis cascade was down-regulated by BMC inoculation, suggesting mitigation of apoptosis to be a key BMC-promoted mechanism. Along this line of thought, caspases that activate the apoptotic cascade are also activated by oxidative stress that increases for instance through photodamage to Symbiodiniaceae during thermal stress and in turn further contribute to symbiont loss (39). We hypothesize that down-regulation of orthogroups involved in apoptosis and the concomitant up-regulation of ROS scavenger orthogroups, promoted by BMC inoculation, protected corals from tissue damage, ROS and Symbiodiniaceae loss, with consequences for coral survival, although more experiments are necessary to validate it. Of note, our results corroborate the hypothesized role of ROS scavenging as a key BMC mechanism, as proposed by Peixoto et al. (9, 10).

Our data also suggest that BMC provision mitigated the up-regulation of pathways correlated with carbohydrate (such as gluconeogenesis, citrate cycle, and starch and sucrose metabolism) and amino acids (such as glycine, serine and threonine) metabolism evident in heat-stressed corals. Such observed restructuring of the coral metabolism is likely associated with starvation (40, 41), in a possible attempt to offset the increased amounts of energy needed to counter heat stress and loss of Symbiodiniaceae (42).

Taken together, our results indicate the presence and efficacy of members of the native BMC consortium and suggest some key BMC mechanisms underlying the increased tolerance against bleaching and mortality based on transcriptional

reprogramming of the coral host, which includes mitigation of apoptosis and oxidative stress and metabolic adjustment. Most notably, BMCs seem to exert their beneficial effect as much through activation as through inhibition of specific pathways, respectively genes.

It is tempting to speculate that the increased host survivorship observed in this study is a direct consequence of the genetic changes discussed above, which arguably will result in altered metabolic profiles. In this regard, the observed changes in the metabolomic profile of corals treated with BMC reinforces the hypothesis that the selected microbes play a direct role in increasing coral stress tolerance by means of correspondence between selected traits of BMC bacteria (i.e., DMSP-degradation) and observed metabolic changes. For instance, shifts in BMC-treated metabolomic profiles were signified by a decrease in dimethylsulfoniopropionate (DMSP) concentration and lipidic reservoir maintenance. This connects directly to the presence of M24 in the 16S rDNA data: M24 was exclusively found in BMC-treated samples at T1 and T2, indicating its incorporation into the coral microbiome and was selected due to its ability to degrade DMSP (Supplementary Table 1). Of note, DMSP is mostly produced by algae (such as members of the family Symbiodiniaceae) and its degradation generates antimicrobial compounds, helping to control pathogens (43-45), which accordingly was suggested by Peixoto et al (9, 10) as a desirable BMC trait. In parallel to the evidenced DMSP degradation as one of the direct mechanisms provided by the BMC consortium to ameliorate heat stress, BMC treatment may have also indirectly influenced DMSP metabolism, through the enrichment of bacteria able to assimilate DMSP, such as *Ruegeria* (46), the most abundant genus found in BMC-treated samples during the entire experiment. Furthermore, this genus has been previously observed to inhibit and control

the growth or pathogenicity of *V. coralliilyticus* (47). These results highlight the importance of microbiome restructuring to coral resilience (11, 14) and the additional potential role of the *M. hispida* BMC consortium in modulating the microbial colonization and succession of inoculated coral fragments. Such parallel colonization/succession/enrichment of beneficial microbes has also been observed in other hosts, including humans, as a result of the use of pre- or probiotics (48, 49)

Conclusions

The increasing frequency and severity of ocean warming events has been causing coral die-offs around the world in the last few years (1, 50 – 52). The development and better understanding of novel interventions to mitigate large-scale coral mortality is one of the climate priorities for the coming decades (53). Our results support the potential of microbiome restructuring to aid ecological adaptation of the coral metaorganism (14) and identify a suite of microbial-mediated mechanisms underlying coral survival and resistance to thermal bleaching provided through BMCs. This is most prominently highlighted by the dramatic increase of coral survival rates by 40% upon BMC treatment when under thermal stress. This was accompanied by overall shifts in the coral microbiome that suggest dynamic microbiome restructuring, partially due to the incorporation of BMC members and the relative increase of other bacteria. We further show that such microbiome restructuring affects the host (directly and indirectly) as evidenced by transcriptional reprogramming of processes related to stress tolerance, metabolism, and innate immunity. Prospecting further, it will become important to understand whether a universal coral probiotic ‘potion’ can provide the same efficacy as

a host specific BMC consortium, which could then provide benefits to a range of coral hosts.

Material and methods

Ethics approval and consent to participate

Permission for sampling was obtained from the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO). The microbial survey permits were obtained from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) and SISGEN (Number A620FE5).

Sampling procedures

Mussismilia hispida colonies were collected by SCUBA diving at the Coroa Vermelha reefs, Santa Cruz de Cabralia county, Bahia, Brazil. Coral colonies were collected at three sites along the reef: site A (16°20'57.99" S; 038°58'45.00" W), site B (16°20'39.30" S; 038°58'38.10" W) and site C (16°22'02.20" S; 039°0'15.63" W), at depths between 1.5 and 10 m on 26–29 January 2017. Corals were transported in sterile plastic bags, then packed in Styrofoam boxes containing 800 g of ice and were sent by air cargo to Rio de Janeiro. Upon arrival at the research station, around 13 hours after sampling, coral colonies were transferred to 1,500-L tanks with constant sea water flow and air bubbling for a 3-day preliminary acclimatization period. After that, coral colonies were fragmented using a diamond based bandsaw (Gryphon Corp, California, USA) in ~7 cm fragments with at least 3 polyps each, sawn in the coenosarc and placed in the

experimental system for acclimatization and healing. About 4 days after sawing, the coral fragments showed first signs of healing and were kept in acclimatization conditions (26 °C) until all fragments reached F_v/F_m rates around 0.6.

Isolation of bacteria strains from coral

Three previously tagged thermally resistant coral *Mussismilia hispida* colonies (5–15 cm) collected from Maraú, Bahia, Brazil (13°56'10.9" S; 38°55'38.71" W) were used as a source to isolate beneficial microorganisms for corals. Two different approaches were used for bacterial isolation. First, 0.5 g of each coral macerate was resuspended in 45 mL of sterile saline solution (0.85% NaCl) and then shaken for 16 h. After incubation, triplicate subsamples (100 µL) of 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} dilutions were inoculated into Petri dishes containing 20 mL of marine agar medium (Marine Agar Zobell 2216, Himedia Laboratories, Mumbai, India), diluted marine agar medium (Marine Agar Medium 2x diluted with 2.5% NaCl and agar-adjusted), 2.5% NaCl Luria-Bertani medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 25 g NaCl and 15 g agar to 1000 mL distilled water) or Marine-water medium (1000 mL of sea water and 13 g agar). In addition, fragments of ~0.5 mm were placed directly onto these culture media. All the plates were incubated at 26 °C for 48 h. A total of 133 bacterial colonies were isolated based on bacterial colony morphology, with 67 derived from macerated slurries and 52 derived from mini fragments. Each different morphological colony was stored in an ultra-freezer with a final concentration of 20% glycerol and recovered when necessary for functional screening.

Functional screening for probiotic and bacterial 16S rRNA gene sequencing

Each morphologically different bacterial isolate was screened for beneficial traits for corals as proposed by Peixoto et al. (9). Sixty-seven morphologically distinct bacterial

strains were recovered from macerated slurries and 52 from micro-fragments of the coral placed directly onto the agar medium. The isolates were then screened for beneficial traits, as previously outlined by Peixoto et al. (9) and tested via a proof of concept study (17). Antagonistic activity against *Vibrio coralliilyticus* YB strain (DSM19607) (V1) and *Vibrio alginolyticus* (BAA450) (V2) was tested by the agar-diffusion method (54). First, 20 μ L of each bacterial strain was spot inoculated onto 2.5% NaCl LB medium, placing three spots for each strain (representing replicates). The plates were incubated at 26 °C for as long as necessary for the strain to grow. The strains were inactivated by chloroform volatilization, followed by pouring 3 mL of semi-solid 2.5% NaCl LB medium (0.7% agar) containing the *Vibrio* indicators over the inactivated spots. These plates were then incubated at 28 °C for 16 h, and the antagonistic activity was indicated by inhibition halos around or no detection of *Vibrio* growth over the colony spot. The same procedure was repeated for both V1 and V2, in separate plates. Among the remaining candidates, one strain, identified as *Planococcus rifietoensis* (CM29) was an antagonist against *V. coralliilyticus* YB (DSM19607) (V1), whilst another strain, identified as *Salinivibrio* sp. (F2,) showed antagonistic activity against both V1 and *V. alginolyticus* (BAA450) (V2).

The strains were screened for ROS scavenger enzyme activity, based on qualitative (production or not production) and quantitative (bubble amount) catalase production when 50 mL of their liquid culture was mixed with 50 μ L of 3% (v/v) hydrogen peroxide.

Nitrogen cycling genes as nitrogenase subunits (*nifH*) and nitrification (*nirK*), as well as the DMSP degradation (*dmdA*) gene were screened by PCR reactions from the genomic DNA samples (for additional information about primer and PCR cycling see

Supplementary Table 3). From the initial 133 isolated strains, 33 (25%) isolates demonstrated high catalase activity and positive results for the amplification (Polymerase Chain Reaction) of the genes *nifH* (12 strains, i.e., 9%), *nirK* (5 strains, i.e., 11%) and *dmdA* (11 strains, i.e., 8%). Almost half of the isolates (49% or 65/133) were identified as belonging to the *Vibrio* genus, and were excluded from the following steps, considering they are regularly postulated as coral pathogens (55, 56). A total of 38 strains positive for at least one screened trait described above had their nearly full-length 16S rRNA gene PCR-amplified and sequenced (Supplementary Table 3). The sequencing electropherograms were processed using the Ribosomal Database Project II (RDP) (57) to remove low-quality bases. Sequences of each isolate were assembled into contigs using Bioedit 7.0.5.3 (58). The bacterial 16S rRNA gene sequences were aligned with sequences from the NCBI database (59). All sequences were deposited in the NCBI database under an individual accession number described below (see Supplementary Table 4). Bacteria strains identified as potential human or marine pathogens as well as those with antagonistic activity against any members of the selected BMC consortium (assessed by the agar-diffusion method cited above) were excluded.

Probiotic preparation

A total of six bacterial strains: M20 *Bacillus lehensis* (NCBI access number MK308622), M24 *Bacillus oshimensis* (MK308624), M3 *Bacillus lehensis* (MK308617), M1 *Brachy bacterium conglomeratum* (MK308603), CM29 *Planococcus rifietoensis* (MK308593), and F2 *Salinivibrio* sp. (MK308616), were selected to compose the *M. hispida* BMC consortium, based on the beneficial traits cited above and described in Supplementary Table 1. The probiotic consortium suspension contained a total of 10^8

cells per mL. The cell number of each individual BMC strain was estimated by optical-density spectrophotometer (OD600) (UV-1800 Spectrophotometer (Agilent Cary 60, Agilent Technologies) measurements for cultures grown at 26 °C in 100 mL of LB medium for 8, 16, 22, 30, 42, 48 and 54 h and correlated directly with the number of colony-forming units (CFUs) of each strain at each time point. The CFUs were assessed by subsampling (100 µL) each serial dilution of each strain at each time point, plating on LB agar medium, and incubating under the same conditions. The results were normalized to 1 mL of medium to estimate the cell number at the sampling points (Supplementary Figure 1). As the probiotic consortium is composed of a diverse combination of bacteria, each strain was collected proportionally at the peak of its growth curve in order to compose a consortium with a final concentration of 10^8 cells per mL. The cultures were centrifuged at 5000 g for 2 min and the cell pellets washed 3 times with saline solution (0.85% NaCl), followed by centrifugation and resuspension in 50 mL of saline solution.

Mesocosm experimental design

The experimental mesocosm used for this experiment consisted of 2 water baths (100 cm × 50 cm × 10 cm) per temperature (total of 4 water baths), where 5 individual aquariums (each with 1.3 L capacity, 15 cm × 11 cm × 12 cm) from each treatment were randomly distributed in the mesocosm. Each completely individualized aquarium was an independent true biological replica, with its own individual sump (8.7 L) and circulation pump, and the sump and aquarium assembly contained a total of 10 L of seawater. The water flow between the sump and the aquariums was driven by a water pump (Mini A, Sarlo Better, São Caetano do Sul, Brazil) at a flow rate of 250 mL min⁻¹, providing a tenfold recirculation of the experimental aquarium volume per hour. Every two days, 10%

of the sump water was changed and the salinity adjusted to 34 PSU with deionized water if necessary. The aquariums were supplied with natural seawater from the Marine Aquarium of Rio de Janeiro research station where the experiment was performed. The replicates received individual continuous air bubbling circulation through air pumps (HG-370, Sun Sun) connected to silicone air hoses and flow controllers. The water in the water bath was homogenized by two aquarium pumps (SB 1000A, Sarlo Better) to maintain homogeneous temperatures, and there was no water exchange between the aquariums and the water baths. Thermostat controls MT-518ri (Full Gauge, Canoas, Brazil) measured and controlled the temperature of each water bath, activating the cooling system or heaters as needed. The water baths were connected to a 1000-L freshwater reservoir at 18 °C, to provide cooling water through water pumps (Better 2000, Sarlo Better) when the temperature control thermostat activated the correspondent pump. The heating system consisted of two 100-W heaters (Atman, China) in the water bath. Physical-chemical parameters of the water, including pH, salinity and dissolved oxygen (OD) were measured on the sampling days, using a multiparameter probe (Model HI 9,828, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo). The experiments followed artificial day/night cycles (12h/12h) with 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from 06:00 to 10:00 and from 14:00 to 18:00h, and 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from 10:00 to 14:00h, modulated with light dimmers and a shade cloth. Each replicate individual aquarium had its own lighting system, consisting of six 3W blue-light and three 3W white-light LEDs each controlled by a potentiometer. Four coral fragment fragments (~ 7 cm) of *M. hispida* were placed randomly in each aquarium, and a single fragment was randomly used as a sampling unit for each treatment and sampling time.

Mesocosm experiment

A total of 80 coral fragments of *M. hispida* were exposed to two temperature regimes, 30 °C (high-temperature regime) and 26 °C (ambient-temperature regime), and two treatments, placebo or BMCs. A total of four coral fragments (~ 7 cm) were placed randomly in each aquarium, consisting of a completely independent replica and each treatment used five of these aquaria. One fragment was randomly used as a sampling unit for each treatment and sampling time. All coral fragments were first maintained under the same conditions at 26 °C for 30 days to allow them to heal and acclimatize to the experimental conditions. For the high-temperature experiment, the temperature was increased, from day 0 to day 8 by 0.5 °C per day up to 30 °C which was maintained for 10 days. Then, the temperature was decreased to 26°C by 1 °C per day, followed by 23 days of recovery. All control experiment aquariums were maintained at 26 °C during the 75 experimental days. Sampling points were: before heat stress (T0), at the peak of temperature (T1), at the last day of high temperature (T2), and after the recovery period (T3). Samples from the ambient-temperature experiment were also taken in parallel at the same time points. The placebo and BMCs were inoculated on the first day of the experiment and every 5 days thereafter; during the 10 days at the temperature peak, inoculations were performed every 3 days. A detailed schematic view of the experimental design is shown in Figure 1-A. Inoculations were performed by removing the coral fragments from the aquarium and placing them in a sterile Petri dish to inoculate 1 mL of the respective treatment above the fragments. After the inoculation, the fragments were immediately returned to their respective aquariums and the individual Petri dishes were rinsed into the aquarium water.

Assessment of coral health and microbiome

Coral health was assessed during the experiment using different proxies, including visual monitoring of bleaching and algal photosynthetic parameters. The coral visual response was assessed by color score, based on the tissue appearance: 1) white (>80% of colony white, with no visible pigmentation); 2) pale (>10% colony affected by pigment loss); or 3) fully pigmented (<10% colony with pale coloration). Coral mortality was scored as 0. Each replicate was photographed at each sampling time, with a Canon T3i digital camera, under the same conditions, and the color was scored based on the photographic assessment.

The photochemical efficiency of the Symbiodiniaceae was assessed using pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry. We used a submersible diving-PAM system (Walz GmbH, Effeltrich, Germany) fitted with a red-emitting diode (LED, peak at 650 nm). To avoid non-photochemical processes of dissipation of PSII excitation energy, measurements were taken after sunset, after at least 30 minutes of darkness, to ensure full photochemical dissipation of the reaction centers. The maximum quantum yield of PSII photochemistry was determined as F_v/F_m . The diving-PAM was configured as follows: Measuring Light Intensity (MI) = 5; Saturation Pulse Intensity (SI) = 8; Saturation Pulse Width (SW) = 0.8, Gain (G) = 2; and Damping (D) = 2. The same coral fragment from each replicate (= 4 fragments) was used to measure chlorophyll fluorescence at different sampling times during the experiment. The statistical significance of the results was analyzed in PAST3.

Assessment of coral microbiome through 16S rRNA gene amplicon sequencing

The coral microbiome was assessed by 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. Samples of the mucus layer, tissue and skeleton of the coral were collected with sterile clippers at the sampling time. Samples from each sampling time point were macerated with a mortar and pestle under dry conditions. Total DNA was extracted from 0.5 g of the macerated mucus, tissue or skeleton using the PowerBiofilm® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.), following the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined using a Qubit® 2.0 Fluorometer High Sensitivity DNA Kit (Invitrogen, USA).

To amplify the hypervariable regions V5 and V6 of the bacterial 16S rRNA gene, the primers 784F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGGATTAGATACCCTGGTA-3') and 1061R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCRRRCACGAGCTGACG AC-3') (60) were used (Illumina adapter sequences underlined). Triplicate PCRs (using 1 µl of input DNA) were performed with the Qiagen Multiplex PCR kit, with a final primer concentration of 0.3 µM in a final reaction volume of 10 µl. In addition to samples, mock PCRs were run (no template input) to account for putative kit contaminants. Thermal cycler conditions were: initial denaturation at 95 °C for 15 min, 27 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 90 s, and 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. Then, 5 µl of each PCR product was run on a 1% agarose gel to confirm successful amplification. Triplicate PCRs for each sample were pooled and samples cleaned using ExoProStar 1-step (GE Healthcare, UK). Samples were indexed using the Nextera XT Index Kit v2 (dual indices and Illumina sequencing adaptors added). Successful addition

of indexes was confirmed by comparing the length of the initial PCR product to the corresponding indexed sample on a 1% agarose gel. Samples were cleaned and normalized using the SequalPrep Normalization Plate Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The samples were then pooled in an Eppendorf tube (4 µl per sample) and concentrated using the CentriVap Benchtop Vacuum Concentrator (LABNOCO, USA). The quality of the library was assessed using the Agilent High Sensitivity DNA Kit in the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and quantified using Qubit (Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit, Invitrogen). Library sequencing was performed at 5 pM with 20% phiX on the Illumina MiSeq Illumina platform at the KAUST Bioscience Core Lab at 2 × 301 bp paired-end V3 chemistry, according to the manufacturer's specifications.

Coral microbiome data analyses

The microbiota associated with *M. hispida* fragments was investigated by sequencing the V5-V6 variable region of the 16S rRNA gene. A library of 3,501,072 good-quality reads with a mean length of 283.64 base pairs was generated. Demultiplexed raw sequences were imported into QIIME2 2019.4 for analysis. Sequences were merged, denoised, dereplicated, clustered, and trimmed using the DADA2 (“dada2 denoise-paired”) plugin with the following parameters: -p-trim-left-f 5 --p-trim-left-r 5 --p-trunc-len-f 250 --p-trunc-len-r 250 and 4775 amplicon sequence variants (ASVs) were obtained. The ASVs were classified taxonomically using the naive Bayes machine-learning classifier (61) with the q2-feature-classifier parameter, using the SILVA132 (62) trained classifier clustered at 99% identity as the reference database. A rooted phylogenetic tree was created for downstream analyses, using the programs MAFFT2 (63) and

FastTree with CAT-like rate approximation category through Q2- alignment and Q2- phylogeny plugins. The microbial QIIME2 output (qza files) were imported to R programming language V 3.6.0 with the function qiime2R and analyzed with the Phyloseq (64), parsed with the dplyr package (65), and the barplots, box-plots and statistical test (kruskal-wallis and Anova) were generated with ggplot2 (66). The data were tested for differential abundance using DESeq2 (67) on a model of Negative Binomial Distribution (NEB); a Wald Test with parametric fitting of dispersions to the mean intensity was used for differential abundance estimation, using a cut-off value of $p = 0.01$. For NMDS analyses, the data were log₂-transformed ($\log x + 1$), and ordination was performed with the Bray-Curtis distance matrix until a solution was reached (i.e., stress). The results were plotted with function plot_ordination using the samples, treatments or environment metadata for features ordination. The significance of the results was evaluated with PERMANOVA, using 999 random permutation tests with pseudo F-ratios through the Adonis function of the Vegan package (68) in R. The community structure of the microbiome (represented by diversity and richness measures), was evaluated (from 0 to 3,000 reads) using classic ecological indexes of alpha-diversity (Observed ASVs, Chao1 and Shannon) on the rarefaction curve plateau (Supplementary Figure 3) using Phyloseq package .

Metabolomics assessment

Fragments from each coral sample produced (300.00 mg) were homogenized with 80% methanol (1.50 mL) using zirconia bids and sonicated for 8 min at room temperature. The extraction mixtures were centrifuged at 10,000 *g* for 10 min at 4 °C and the

supernatants were concentrated to dryness under vacuum. This procedure was repeated three times for maximum recovery. The residues were resuspended in methanol-*d*₄ (200.00 mL) for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) data acquisition, using 3-mm tubes and a 600 MHz Bruker Avance III equipped with a 5-mm TCI H-C/N-D cryoprobe and a SampleJet autosampler cooled samples to 6 °C while waiting in the queue. The 1D spectra (noesypr1D) experiment was used to assess the metabolomic profile of the dataset and 2D experiments HSQC and HMBC (hsqcedetgpsisp2.2 and hmbcetgpl3nd, respectively) were used to confirm the identity of key compounds. Quality control samples were included, and they have shown to be according to the expected. The spectra were processed using NMRpipe and imported into MATLAB for normalization, scaling, and multivariate analysis, using an in-house toolbox (developed in the Edison laboratory; 69). The PLS-DA analysis was done using the 1D NMR spectra in full resolution and the boxplot was constructed using the area under the curve of the peaks related to DMSP (2.88 ppm) and DMSO (2.58 ppm). The statistical difference of DMSP and DMSO between sampling times and treatments was assessed with an Independent Samples *t*-Test.

Transcriptomics Assessment

The coral-metaorganism transcriptomes response from T3 was explored in order to understand the mechanisms associated with the different phenotypes observed at the end of the experiment. RNA samples were extracted from both the BMC and placebo treatment from the high-temperature (30 °C) and ambient (26 °C) experiment for sequence analysis. Transcriptomic sequencing was performed using Illumina HiSeq 6000 platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Transcriptomic reads were quality-

controlled using KneadData v0.7.4 with the GRCh38.p13 human genome as a reference for potential decontamination yielding between 14,372,271 and 74,483,759 paired-end (PE) reads at 2x150 bases per sample after quality trimming and filtering. De-novo transcriptomes were co-assembled using rnaSPAdes v3.13.1 (70), producing 520,555 representative transcripts from 496,603 putative genes; genes were estimated by rnaSPAdes.

We used TransDecoder v5.5.0 (71) for gene modeling in a multistep process to minimize false positives. In particular, we used the following procedure: 1) *TransDecoder.LongOrfs*, with transcript-to-gene mappings assigned by rnaSPAdes, to generate putative open reading frames (ORFs); 2) *hmmscan* (hmmer v3.3.1 suite) (72) to identify protein domains using the PFAM v33.1 and TIGRFAM v15.0 databases; 3) Diamond v0.9.30.131 (73) *blastp* against all *Scleractinia* (stony corals) proteomes available in NCBI (GCA_002571385.1, GCF_002042975.1, GCA_003704095.1, GCF_004143615.1, GCF_002571385.1, GCF_003704095.1, and GCF_000222465.1); and 4) *TransDecoder.Predict* with the putative ORFs from (1), the protein domains from (2), and the alignments from (3) using the `--single_best_only` argument. This procedure generated a single ORF per transcript to yield 130,183 ORFs from 114,118 genes.

High-quality genes were annotated by using Diamond's *blastp* against NCBI's *nr* database (v2020.04.01), and taxonomic lineages were extrapolated from NCBItaxid using the *get_taxonomy_lineage_from_identifier* function from soothsayer v2020.08.24 (<https://github.com/jolespin/soothsayer>) with ete3 backend (74). PhyloDB v1.076 was used for additional annotations such as KEGG ortholog assignments.

Orthogroup Assessment

Orthogroups were identified using OrthoFinder v2.4.0 (75) with the high-quality proteins generated from our TransDecoder procedure and all of the *Scleractinia* proteomes listed previously. Annotations for orthogroups were assigned by using the most common organism-agnostic annotation within the grouping.

Host-Transcriptomics Differential Expression Assessment

We assessed differential expression through a comparative genomics perspective for increased ecological interpretability. We aggregated the counts for each orthogroup to generate an orthogroup expression table with 27,140 orthogroup features. We filtered the expression table to include only orthogroups that were in at least 95% of the samples, to yield a filtered counts table with 17,202 orthogroup features.

For differential expression analysis, we used the 17,202 orthogroup set with the exactTest from edgeR v3.28.0 (76) and visualized the distributions and differentially expressed groups (DEG) using *plot_volcano* from soothsayer Python package (<https://github.com/jolespin/soothsayer>). Each condition had at least three biological replicates. The conditions investigated were the following: (1) placebo (26 °C) vs placebo (30 °C) [FDR < 0.01, 408 DEGs]; (2) BMC(26 °C) vs BMC(30 °C) [FDR < 0.02, 34 DEGs]; (3) placebo (30 °C) vs BMC (30 °C) [FDR < 0.05, 1 DEGs] (Supplementary Table 4). As the placebo treatment consisted of 0.85% NaCl solution alone, DEGs showing a significant difference (FDR $p < 0.01$) between “placebo 30 °C × placebo 26 °C” were considered orthogroups affected by the heat stress, and those presenting KEGG-Pathway annotation in this condition were used to detect up- or down-regulation in other samples and to generate a heatmap based on the log fold-change parameters. In

addition, we manually searched for orthogroups associated with host inflammasome and oxidative stress in response to thermal perturbation, as well as DNA repair in the metatranscriptome. The log fold-change values rather than FDR was considered to assess differences between samples. Orthogroups that were not present in more than 95% of the samples were not considered. Functions were only considered affected by BMC treatment if more than 50% of the searched genes had the same pattern (up or downregulated) by BMC 30 °C when compared with Placebo 30 °C. The log fold-change and FDR values for each orthogroups searched can be found on Supplementary Table 4.

Acknowledgments

This research project won the Great Barrier Reef Foundation's Out of the Blue Box Reef Innovation Challenge People's Choice Award supported by The Tiffany & Co. Foundation. It also received support from the Graduate Programs of Science (Microbiology) and Plant Biotechnology and Bioprocess Engineering (PBV)/Federal University of Rio de Janeiro, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rio de Janeiro Marine Aquarium Research Center and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ). We thank Damiana Pimenta and Rodrigo Grilo for their logistical and sampling support in Maraú peninsula. We also thank the CCRC NMR Facility, especially Dr. Arthur S. Edison, for their instrumentation for NMR data collection.

References

1. HUGHES, T. P. et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*, **359**, 80-83 (2018).
2. VAN OPPEN, M. J. H. et al. Shifting paradigms in restoration of the world' s coral reefs. *Global Change Biology*, **23**, 1–12 (2017).
3. PEIXOTO, R. S.; SWEET, M.; BOURNE, D. G. Customized medicine for corals. *Frontiers in Marine Science*, **6**, 686 (2019).
4. LAJEUNESSE T.C., et al. Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* **28**, 2570–2580 (2018).
5. MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, **27**, 454-460 (1977).
6. ROHWER, F. et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine ecology Progress Series*, **243**, 1–10 (2002).
7. BANG, C. et al. Metaorganisms in extreme environments: do microbes play a role in organismal adaptation? *Zoology*, **127**, 1-19 (2018).
8. JASPERS, C. et al. Resolving structure and function of metaorganisms through a holistic framework combining reductionist and integrative approaches. *Zoology*, **133**, 81-87 (2019).
9. PEIXOTO, R. S. et al. Beneficial microorganisms for corals (BMC): proposed mechanisms for coral health and resilience. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 341 (2017).
10. PEIXOTO et al., (2021)
11. ZIEGLER, M., SENECA, F. O., YUM, L. K., PALUMBI, S. R. & VOOLSTRA, C. R. Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. *Nat. Commun.* **8**, 14213 (2017).
12. BANG C. et al. Metaorganisms in extreme environments: do microbes play a role in organismal adaptation? *Zoology*. **127**, 1–19 (2018).
13. ZIEGLER, M. et al. Coral bacterial community structure responds to environmental change in a host-specific manner. *Nature communications*, **10**, 1, 1-11 (2019).

14. VOOLSTRA, C. R.; ZIEGLER, M. Adapting with microbial help: microbiome flexibility facilitates rapid responses to environmental change. *BioEssays*, **42**, 2000004 (2020).
15. RESHEF, L., KOREN, O., LOYA, Y., ZILBER-ROSENBERG, I., ROSENBERG, E. The coral probiotic hypothesis. *Environ. Microbiol.* **8**, 2068–2073 (2006).
16. ROBBINS, S.J., et al. A genomic view of the reef-building coral *Porites lutea* and its microbial symbionts. *Nat Microbiol* **4**, 2090–2100 (2019).
17. ROSADO, P.M., et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *ISME J* **13**, 921–936 (2019).
18. WILLIAMS et al. (2015)
19. WEBSTER, N.S.; REUSCH, T.B.H. Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *The ISME journal*, **11**, 2167-2174 (2017).
20. ZANEVELD, J. R., MCMINDS, R., THURBER, R. V. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nature microbiology*, **2**, 1-8 (2017).
21. SILVA, D. P., et al. Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals. *Ecology and Evolution*, **9**, 5172–5185. (2019).
22. BEN-HAIM, Y. et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 309–315 (2003).
23. ALVES, N. J. et al. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. *Environmental Microbiology Reports*, **2**, 90–95 (2010).
24. MORGANS, C.A. et al. Symbiodiniaceae probiotics for use in bleaching recovery. *Restoration Ecology*, **28**, 282-288 (2020).
25. SANTOS, H. F. et al. Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Scientific reports*, **5**, 1-11, (2015).
26. POOTAKHAM, W. et al. Heat-induced shift in coral microbiome reveals several members of the Rhodobacteraceae family as indicator species for thermal stress in *Porites lutea*. *Microbiology Open*, **12**, 935 (2019).
27. VILLELA, H. Microbiome Flexibility Provides New Perspectives in Coral Research. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, p. e2000088-e2000088, (2020).

28. SWEET, M., et al. Compositional homogeneity in the pathobiome of a new, slow-spreading coral disease. *Microbiome* **7**, 139 (2019).
29. SANTOS, H.F., CARMO, F.L., PAES, J.E.S. et al. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. *Water Air Soil Pollut* **216**, 329–350 (2011).
30. PANDEY P., BISHT S., SOOD A., AERON A., SHARMA G.D., MAHESHWARI D.K. (2012) Consortium of plant growth-promoting-bacteria: future perspectives in agriculture. In: Maheshwari D.K. (ed) *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics*. Springer, Berlin, pp 185–200.
31. de SOUZA, R. S.C. et al. From Microbiome to Traits: Designing Synthetic Microbial Communities for Improved Crop Resiliency. *Frontiers in plant science* **11**, 1179 (2020).
32. SWEET, M.J., BROWN, B.E., DUNNE, R.P. et al. Evidence for rapid, tide-related shifts in the microbiome of the coral *Coelastrea aspera*. *Coral Reefs* **36**, 815–828 (2017).
33. TAKAHASHI, S., BAUWE, H., BADGER, M.R. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **144**, 487–94 (2007).
34. LESSER, M. P. et al. Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral reefs* **8**, 225-232 (1990).
35. BIERI T., ONISHI M., XIANG T., GROSSMAN A.R., PRINGLE J.R. Relative contributions of various cellular mechanisms to loss of algae during cnidarian bleaching. *PLoS One* **11** (2016).
36. DUNN S.R., PERNICE M., GREEN K., HOEGH-GULDBERG O., DOVE S.G. Thermal stress promotes hostmitochondrial degradation in symbiotic cnidarians: are the batteries of the reef going to run out? *PLoS One* **7**, 39024 (2012).
37. CROSS, T. G. et al. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis,.*Experimental Cell Research* **256**, 34-41 (2000).
38. KUROKAWA M., KORNBLUTH S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell Volume* **138**, 838-854 (2009).
39. WEISS V.M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of Experimental Biology* **211**, 3059-3066 (2008).

40. BORELL, E. M., BISCHOF, K. Feeding sustains photosynthetic quantum yield of a scleractinian coral during thermal stress. *Oecologia* **157**, 593–601 (2008).
41. BORELL, E. M., YULIANTRI, A., BISCHOF, K., RICHTER, C. The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **364**, 116–123 (2008).
42. RADECKER et al 2020
43. GARREN, M. et al. A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals. *The ISME journal* **8**, 999-1007 (2014).
44. RAINA, J.B. et al. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. *PeerJ*, **4**, e2275 (2016).
45. RAINA, J.B. et al. Subcellular tracking reveals the location of dimethylsulfoniopropionate in microalgae and visualises its uptake by marine bacteria. *Elife* **6**, e23008 (2017).
46. WIRTH, J.S. et al. Dimethylsulfoniopropionate Sulfur and Methyl Carbon Assimilation in *Ruegeria* Species. *Mbio* **11**, 2 (2020).
47. MIURA, N. et al. *Ruegeria* sp. strains isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis* inhibit growth of the temperature-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Marine Biotechnology* **21**, 1-8 (2019).
48. DAHIYA, D. K. et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Frontiers in microbiology* **8**, 563 (2017).
49. SHIN, D. et al. Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs. *PloS one* **14**, e0220843 (2019).
50. EAKIN, C.M. et al. Caribbean corals in crisis: record thermal stress, bleaching, and mortality in 2005. *PloS one* **5**, e13969 (2010).
51. BAHR, K.D., RODGERS, K.S., JOKIEL, P.L. Impact of three bleaching events on the reef resiliency of Kāne ‘ohe Bay, Hawai ‘i. *Frontiers in Marine Science* **4**, 398 (2017).
52. DUARTE, G.A.S. and VILLELA H.D.M. et al. Heat waves are a major threat to turbid coral reefs in Brazil. *Frontiers in Marine Science* **7**, 179 (2020).

53. National Academies of Science, Engineering and Medicine (2019). A Decision Framework for Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs. Washington, DC. The National Academies Press.
54. GIAMBIAGI-MARVAL, M. et al. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. Journal of general microbiology **136**, 1591–1599 (1990).
55. VIDAL-DUPIOL J., et al. Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. J Exp Biol. **214**, 1533–45 (2011).
56. VIDAL-DUPIOL J., et al. Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. J Biol Chem. **286**, 22688–98 (2011).
57. COLE, S.E., LARIVIERE, F.J., MERRIKH, C.N., MOORE, M.J. A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. Mol Cell. **34**, 40–50 (2009).
58. HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. **41**, 95–8 (1999).
59. ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. **215**, 403–10 (1990).
60. ANDERSSON, A.F., LINDBERG, M., JAKOBSSON, H., NYRÉN, P., ENGSTRAND, L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS ONE **3**, 2836 (2008).
61. BOKULICH, N.A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. Microbiome **6**, 90 (2018).
62. HENDERSON, G. et al. Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework. PeerJ **7**, e6496, (2019).
63. KATO H., KUMA K.-I. H., T., MIYATA T. Mafft version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research **33**, 511–518 (2005).
64. MCMURDIE, P.J., HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One **8**, 61217 (2013).
65. WICKHAM, H., FRANCOIS, R., HENRY, L., MÜLLER, K. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R Package Version 0.7.3 (2017).

66. WICKHAM, H. ggplot2. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, **3**, 180-185, (2011).
67. LOVE M.I., HUBER W., ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology **15**, 550 (2014).
68. OKSANEN J. et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6 (2019). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
69. ROBINETTE, S.L. et al. Hierarchical alignment and full resolution pattern recognition of 2D NMR spectra: application to nematode chemical ecology. Anal. Chem. **83**, 1649–1657 (2011).
70. BUSHMANOVA E., ANTIPOV D., LAPIDUS A., PRJIBELSKI A.D. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. Gigascience **8**, giz100 (2019).
71. HAAS, B. J., et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature protocols **8**, 1494–1512 (2013).
72. EDDY S.R. Accelerated profile HMM searches. PLoS Comput Biol, **7**, e1002195 (2011).
73. BUCHFINK B., XIE C., HUSON D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. Nat Methods. **12**, 59-60 (2015).
74. HUERTA-CEPAS J., SERRA F., BORK P. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. Molecular Biology and Evolution **33**, 1635-1638 (2016).
75. EMMS D.M., KELLY S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. Genome Biol **20**, 238 (2019).
76. ROBINSON M.D., MCCARTHY D.J., SMYTH G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics **26**, 139-140 (2010).

Figures

Figure 1: (A) Experimental design and detailed temperature, BMC inoculations and sampling layout. (B) Means of F_v/F_m rate (y axis) from coral fragments treated with BMCs or placebo under high-temperature regimes (30 °C) and ambient-temperature regimes (26 °C) during the mesocosm-experiment days (x axis). (C) Heatmap based on the bleaching score attributed to coral fragments treated with BMC or Placebo in the heat stress experiment.



Figure 2:(a) Relative abundance of BMC-consortium members in coral fragments treated with BMCs or placebo and exposed to heat stress (T1, $p=0.028$, T2, $p=0.0001$, T3, $p=0.265$, Kruskal-wallis), where boxes represent the relative mean abundance and the stars represent outliers. **(b)** Box-plot of Log2 Fold change of ASVs with differential abundance ($p = 0.01$) in coral fragments treated with BMCs compared with placebo-treated fragments at T1, T2 and T3. Bars with the same color scale belong to the same taxonomic family.

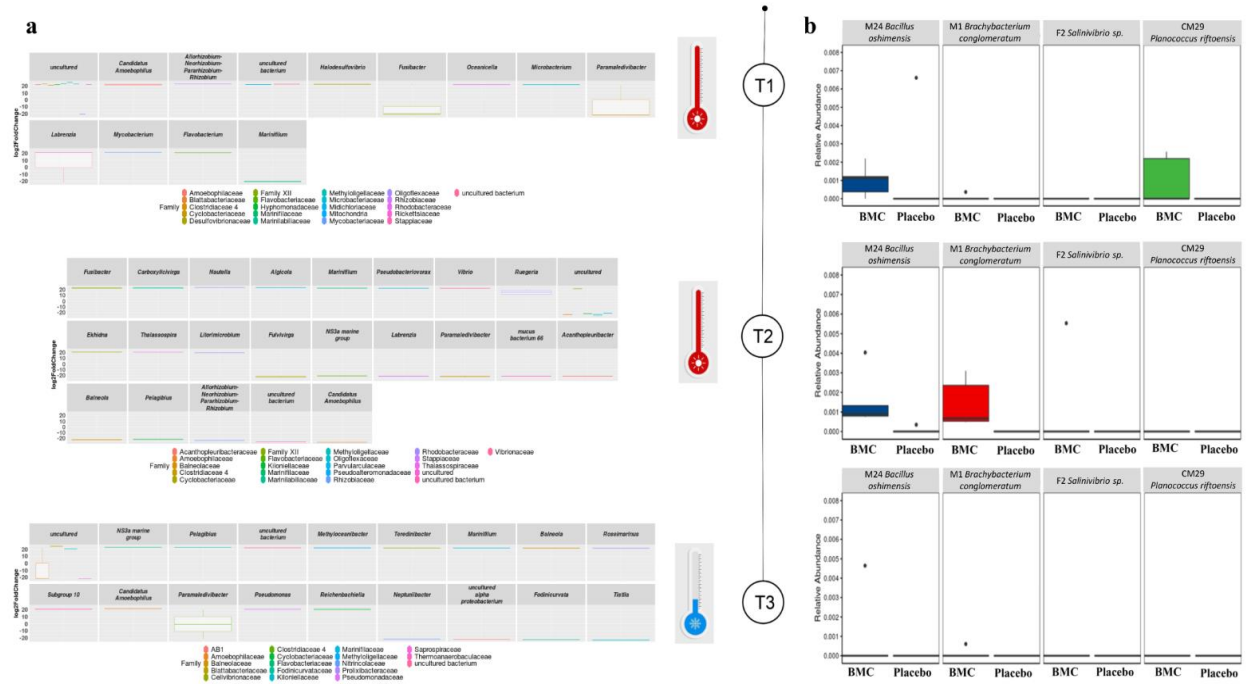


Figure 3: Heatmap of Differentially Expressed Gene (DEG) orthogroups showing KEGG annotation and significant difference (FDR $p < 0.01$) in samples from the end of the experiment (T3), after 23 days of recovery at 26 °C. Orthogroups marked ** are conserved among Scleractinia, Orthogroups marked * are exclusively from *Mussismilia hispida*.

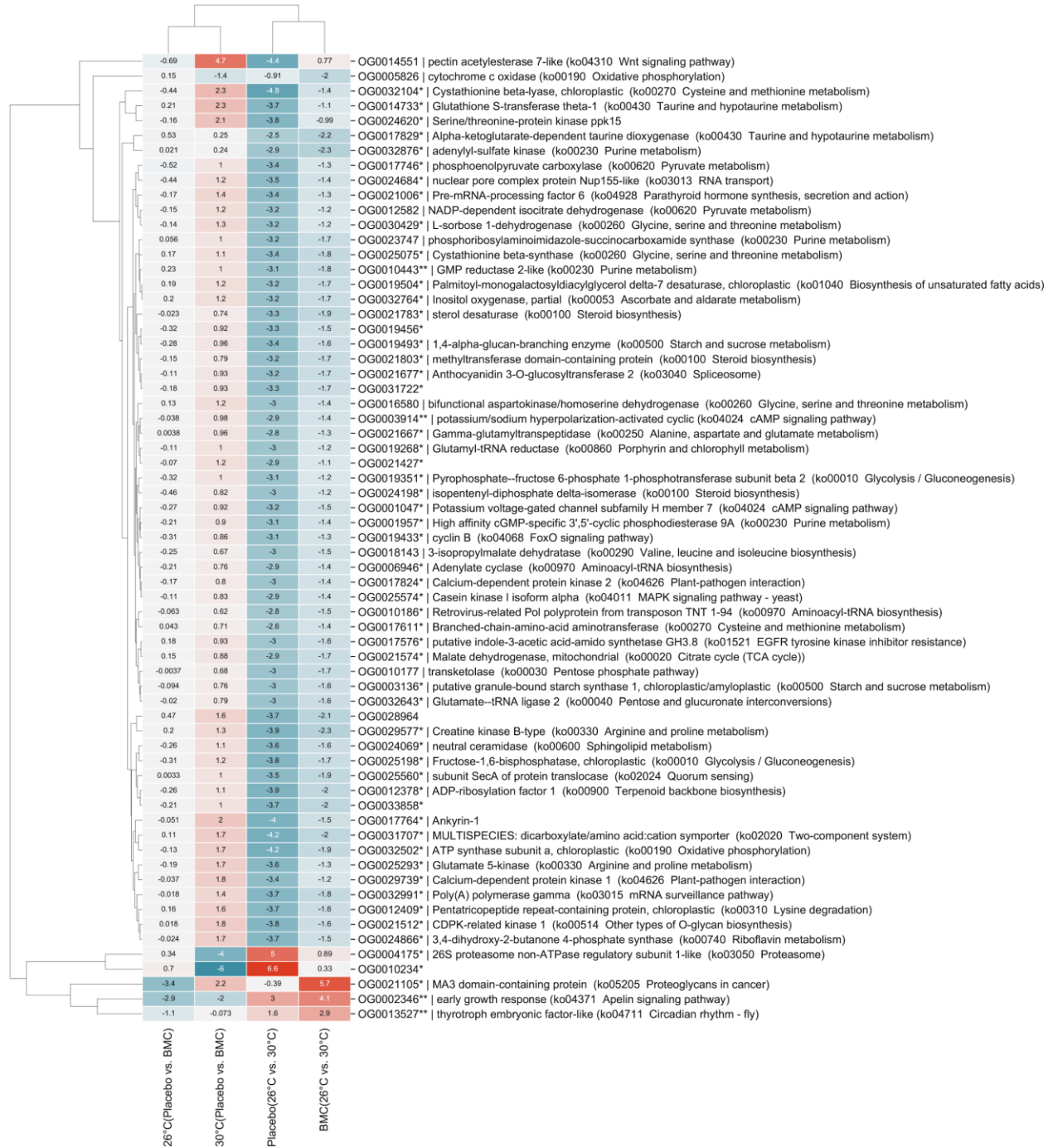


Figure 4: Score plot with 95% confidence ellipses showing samples clustering by PLS-DA (A) and color-coded Loading plot (B; in which colors indicate variation intensity) from PLS-DA of the ^1H NMR dataset comparing the metabolic patterns from coral fragments treated with BMCs and placebo during the thermal stress experiment. Peaks from the Loading plot (resonances from annotated as lipids, DMSP and DMSO) pointing upwards are correlated with BMC-treated samples (grouped in the positive quadrant of PC1 in the Score plot), and those pointing downwards are correlated with the Placebo samples (grouped in the negative quadrant of PC1 in the Score plot). Boxplots provided to access semi-quantitative evaluations of the characteristic DMSP peak at 2.88 ppm and DMSO peak at 2.58 ppm across sampling time and treatment independently.

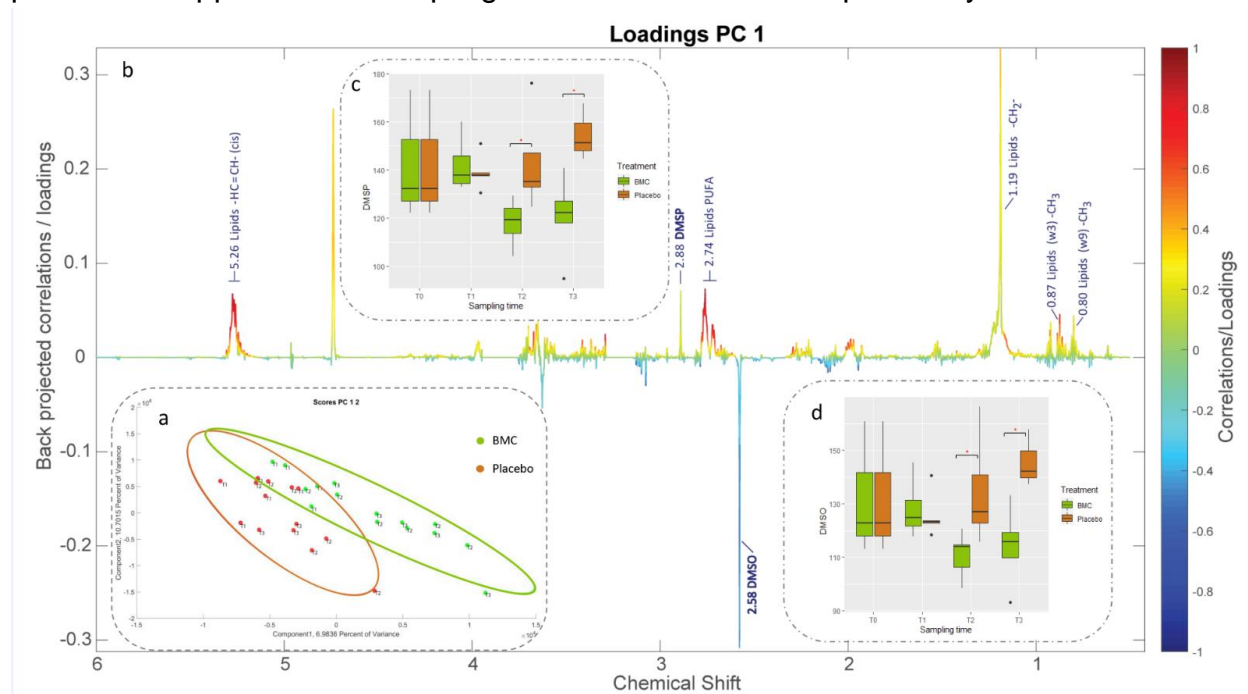
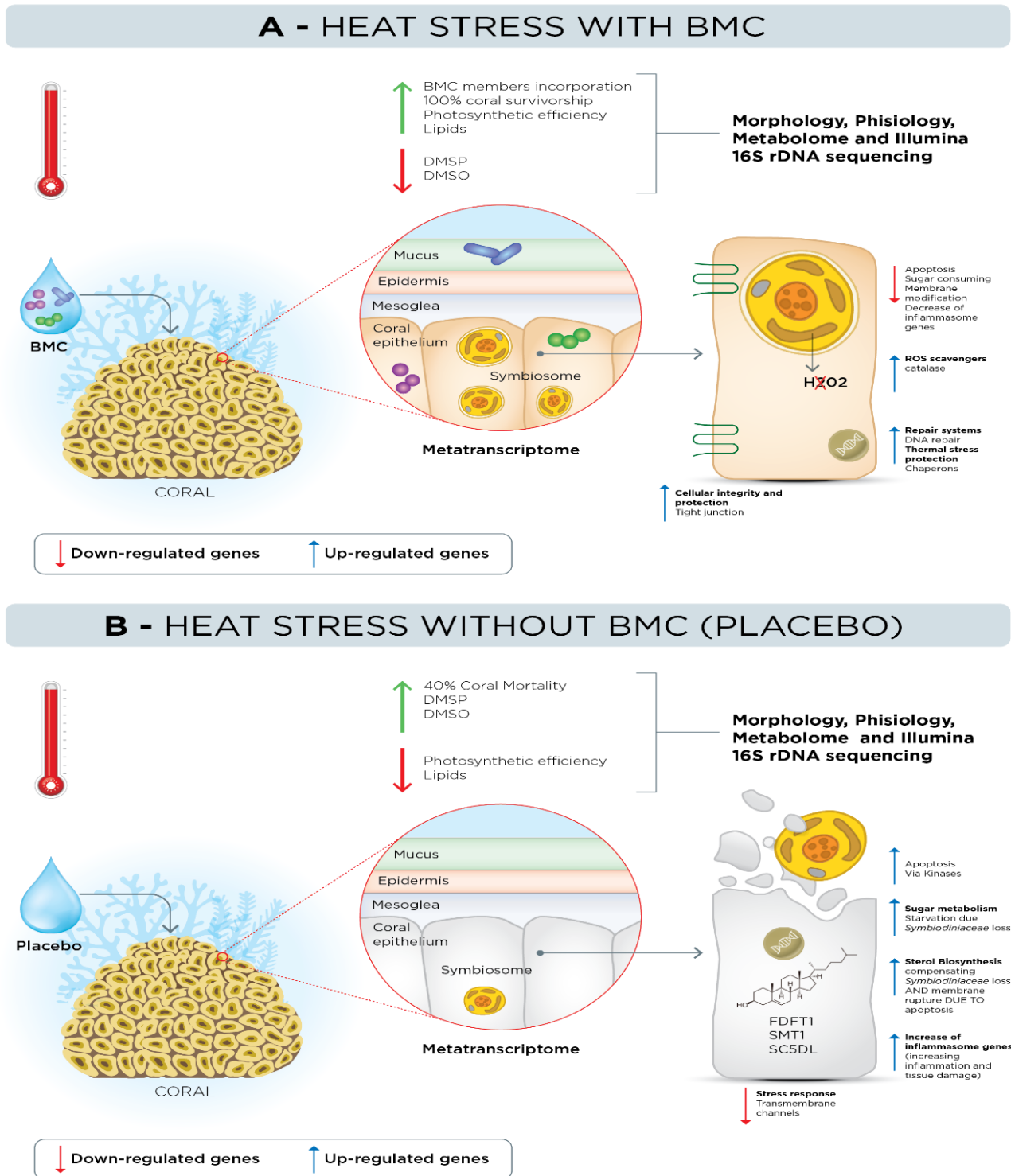


Figure 5: Summary of the overall responses observed at the end of the 75-day mesocosm experiment, after the recovery period, comparing the process in BMC (A) and placebo-treated (B) *Mussismilia hispida* fragments.



6. Conclusões gerais

A partir dos dados gerados no presente trabalho, foi possível obter conclusões ao respeito do papel do microbioma no aumento da termo-tolerância de corais, através da investigação de corais naturalmente resistentes ao estresse térmico e da manipulação de microrganismos benéficos para corais (BMC) para mitigação do estresse térmico causado pelas mudanças climáticas.

Na primeira parte do estudo, colônias de *Mussismilia hispida* afetadas (sensíveis) e não afetadas (resistentes) pelo branqueamento em massa de 2016 demonstraram diferenças na tolerância de temperatura. Visualmente, corais resistentes não sofreram branqueamento a 32 °C e recuperaram a eficiência fotossintética das algas endossimbióticas após o término do estresse térmico. Enquanto isso, corais sensíveis apresentaram branqueamento severo e taxa de mortalidade de 25% a 30 °C. Os microbiomas de corais resistentes e sensíveis também se mostraram diferentes, e foi possível associar funções e táxons bacterianos indicadores de resistência. Dessa forma, concluiu-se que o microbioma é um fator determinante na resiliência de corais frente ao estresse térmico e que o dinamismo/flexibilidade do microbioma também pode influenciar na capacidade de adaptação do holobionte coral. Além disso, corais resistentes podem ser usados futuramente como recurso para evolução assistida e como fonte de microrganismos para intervenções de mitigação do estresse térmico.

A segunda parte desse trabalho foi justamente utilizar colônias de *M. hispida* identificadas e marcadas como resistentes como fonte de microrganismos para o desenvolvimento de probióticos para corais. Essa estratégia biotecnológica utiliza microrganismos nativos do próprio coral de interesse, consistindo em uma estratégia customizada. Dessa forma, essa estratégia minimiza riscos biológicos associados a utilização de organismos exóticos. A partir da utilização desse probiótico em corais adultos sob condições de branqueamento, foi possível chegar em diversas conclusões importantes para a área de microbiologia de corais e biotecnologia. O microbioma de corais de *M. hispida* tratados com BMC sofreu alterações durante o estresse térmico e demonstrou uma recuperação após período à 26 °C. Membros do consórcio probiótico foram detectados no microbioma do coral, indicando a manipulação e reestruturação da comunidade microbiana. A manipulação do microbioma com BMC levou a alterações

metabólicas e ativação de sistemas de reparo de estresse oxidativo e imunológico do coral hospedeiro, resultando no aumento de 40% de sobrevivência após a exposição à estresse térmico. A manipulação com BMC, estimulou ainda a degradação de DMSP e diminuição a ativação de sistema de apoptose e inflamação, o que parece estar diretamente ligado ao aumento da taxa de sobrevivência. Dessa forma, foi possível concluir com esse estudo a eficiência da manipulação do microbioma a partir de estirpes bacterianas nativas na resiliência e sobrevivência de corais sob condições de branqueamento. Além disso, mecanismos de danos celulares foram mitigados através da manipulação probiótica, indicando possíveis mecanismos associados à resiliência e proteção de corais contra estresse térmico que podem ser futuramente explorados. A utilização de BMCs possui, dessa forma, grande potencial para futuras aplicações em campo, com o objetivo de prevenir a mortalidade em massa de corais durante eventos de branqueamento. Adicionalmente, outras questões acerca da aplicação e os efeitos no recife surgem a partir desse estudo. Essas questões incluem avaliar se a prévia inoculação de BMC durante um evento de estresse térmico pode conferir resistência/resiliência aos corais durante uma posterior exposição; ou ainda se probióticos específicos possuem efeito global em outras espécies de corais e/ou animais marinhos. Além disso, o desenvolvimento de uma abordagem para entregar o probiótico BMC para corais em escalas maiores também necessita investigação. As propostas e perspectivas futuras representam o direcionamento da linha de pesquisa desenvolvida no presente trabalho, assim como o aperfeiçoamento de uma estratégia de mitigação do estresse térmico em recifes de corais.

7. Referências

- AINSWORTH, T. D. et al. Climate change disables coral bleaching protection on the Great Barrier Reef. **Science**, v. 352, n. 11, p. 338–342, 2016.
- AINSWORTH, T. D., THURBER, R. V., GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends Ecol. Evol.** v. 25, p. 233–240, 2010.
- ALNEBERG, J., et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature methods**. v. 11, p. 1144–1146, 2014.
- ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, p. 403–10, 1990.
- ALVES, N. J. et al. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p. 90–95, 2010.
- AMARAL, F.M.D. et al. An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (hydrozoa: cnidaria), including the description of a new species. **Zootaxa**, v. 1930, p. 56 – 68, 2008.
- ANDERSSON, A. F., LINDBERG, M., JAKOBSSON, H., NYRÉN, P., ENGSTRAND, L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 3, p. 2836, 2008.
- AYERS, G. P.; GRAS, J. L. Seasonal relationship between cloud condensation nuclei and aerosol methanesulphonate in marine air. **Nature**, v. 353, p. 834–835, 1991.
- BAHR, K.D., RODGERS, K.S., JOKIEL, P.L. Impact of three bleaching events on the reef resiliency of Kāne ‘ohe Bay, Hawai ‘i. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 398, 2017.
- BAIRD, A. H.; MARSHALL, P. A. Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef. **Marine Ecology Progress Series**, v. 237, p. 133–141, 2002.
- BANG C. et al. Metaorganisms in extreme environments: do microbes play a role in organismal adaptation? **Zoology**, v. 27, p. 1–19, 2018.
- BANHA, T. N. S., et al. Low coral mortality during the most intense bleaching event ever recorded in subtropical Southwestern Atlantic reefs. **Coral Reefs**, p. 1-7, 2019.
- BASTOS, A.C., et al. Bryozoans are major modern builders of South Atlantic oddly shaped reefs. **Scientific Reports**, v. 8, p. 9638, 2018.
- BECK, M. Coral reefs provide flood protection worth \$ 1.8 billion every year – it’s time to protect them. **The Conversation**. Publicado em: 07/05/2019. Disponível em:

<<https://theconversation.com/coral-reefs-provide-flood-protection-worth-1-8-billion-every-year-its-time-to-protect-them-116636>> Acessado em: 19/07/2019.

BELLANTUONO, A.J., HOEGH-GULDBERG, O., RODRIGUEZ-LANETTY, M. Resistance to thermal stress in corals without changes in symbiont composition. **Proc R Soc**, v. 279, p. 1100–1107, 2012.

BEN-HAIM, Y. et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 309–315, 2003.

BEN-HAIM, Y., ROSENBERG, E. A Novel *Vibrio* Sp. Pathogen of the Coral *Pocillopora damicornis*. **Marine Biology**, v. 141, p. 47–55, 2002.

BERKELMANS R., VAN OPPEN M.J.H. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. **Proc R Soc B**, v. 273, p. 2305–2312, 2006.

BERTUCCI, A. et al. Carbonic anhydrases in anthozoan corals - A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1437–1450, 2013.

BIERI T, ONISHI M, X.T., GROSSMAN A.R., PRINGLE J.R. Relative contributions of various cellular mechanisms to loss of algae during cnidarian bleaching. **PLoS One**, v.11, 0152693, 2016.

BOKULICH, N.A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, p. 90, 2018.

BORATYN, G. M., SCHÄFFER, A. A., AGARWALA, R., ALTSCHUL, S. F., LIPMAN, D. J., MADDEN, T. L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. **Biology direct**. v. 7, p. 12, 2012.

BORELL, E. M., BISCHOF, K. Feeding sustains photosynthetic quantum yield of a scleractinian coral during thermal stress. **Oecologia**, v. 157, p. 593–601, 2008.

BORELL, E. M., YULIANTRI, A., BISCHOF, K., RICHTER, C. The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. **J. Exp. Mar. Bio. Ecol.** v. 364, p. 116–123, 2008.

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

BUCHFINK B., XIE C., HUSON D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nat Methods**. v. 12, 59-60, 2015.

BUDD A.F., FUKAMI, H., SMITH, N.D., KNOWLTON N. Taxonomic classification of the reef coral family Mussidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). **Zoological Journal** v. 166, 465–529, 2012.

BUSHMANOVA E., ANTIPOV D., LAPIDUS A., PRJIBELSKI A.D. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. **Gigascience** v. 8, giz100, 2019.

CAMP, E. F., SCHOEPPF, V., SUGGETT, D. J. How can “Super Corals” facilitate global coral reef survival under rapid environmental and climatic change? **Global change biology**. v. 24, p. 2755-2757, 2018.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, p. 335-336, 2010.

CASTRO, C. B; PIRES, D. O; GOUVEIA, M. T. J; PEREIRA, C. M; CALDERON, E. N; ANSELMO, M. R. **Mergulhando no Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016.

CAVICCHIOLI, R., et al. Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 569-586, 2019.

CERVINO, J. M. *et al.* Changes in zooxanthellae density, morphology, and mitotic index in hermatypic corals and anemones exposed to cyanide. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 5, p. 573–586, 2003.

COLE, S.E., LARIVIERE, F.J., MERRIKH, C.N., MOORE, M.J. A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. **Mol Cell**. 34, 40–50, 2009.

CROSS, T. G. et al. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 34-41, 2000.

DAHIYA, D. K. et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 563, 2017.

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

de SOUZA, R. S.C. et al. From Microbiome to Traits: Designing Synthetic Microbial Communities for Improved Crop Resiliency. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1179, 2020.

DE’ATH, G; LOUGH, J. M; FABRICIUS, K. E. Declining Coral Calcification on the Great Barrier Reef. **Science**. v. 323, p. 116-119, 2009.

DILWORTH, J., et al. Host genotype and stable differences in algal symbiont communities explain patterns of thermal stress response of *Montipora capitata* following thermal pre-exposure and across multiple bleaching events. **Coral Reefs**, 2020.

DRÖGE, J., GREGOR I., MCHARDY, A. C. Taxator-tk: precise taxonomic assignment of metagenomes by fast approximation of evolutionary neighborhoods. **Bioinformatics**. v. 31, p. 817-824, 2014.

DRURY, C., MANZELLO, D., LIRMAN, D. Genotype and local environment dynamically influence growth, disturbance response and survivorship in the threatened coral. *Acropora cervicornis*. **PloS One**. v. 12, 2017.

DUARTE, G. et al. A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality and ocean acidification. **Ecology and Evolution**, p. 1-13, 2015.

DUARTE, G.A.S., VILLELA, H.D.M. et al. Heat Waves Are a Major Threat to Turbid Coral Reefs in Brazil. **Front. Mar. Sci**. v. 7, p. 179, 2020.

DUNN S.R., PERNICE M., GREEN K., HOEGH-GULDBERG O., DOVE S.G. Thermal stress promotes host mitochondrial degradation in symbiotic cnidarians: are the batteries of the reef going to run out? **PLoS one** v. 7, e39024, 2012.

EAKIN, C.M. et al. Caribbean corals in crisis: record thermal stress, bleaching, and mortality in 2005. **PloS one**, v. 5, e13969, 2010.

EDDY S.R. Accelerated profile HMM searches. **PLoS Comput Biol**. v. 7, e1002195, 2011.

EGAN, S.; GARDINER, M. Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 991, 21 jun. 2016.

EMMS D.M., KELLY S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biol**, v. 20, p. 238, 2019.

FELLOUS, A., FAVREL, P., RIVIERE, G. Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. **Mar. Genomics**. v.19, p. 23–30, 2015.

FRANCINI-FILHO, R. et al. Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). **Mar. Pol. Bull.**, v. 56, p. 1008-1014, 2008.

GARCÍA-SAIS, J.R., WILLIAMS, S.M., AMIRREZVANI, A. Mortality, recovery, and community shifts of scleractinian corals in Puerto Rico one decade after the 2005 regional bleaching event. **PeerJ**, 2017.

GARREN, M. et al. A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals. **The ISME journal**, v. 8, p. 999-1007, 2014.

GIAMBIAGI-MARVAL, M. et al. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of general microbiology**, v. 136, p. 1591–1599, 1990.

GILL, H.; PRASAD, J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. In: BÖSZE, Z. (eds) **Bioactive Components of Milk**. Advances in experimental medicine and biology, v. 606, p. 423–454, 2008.

- GOMES, M. Corais da Costa Brasileira. **Brasil Reef**. Publicado em: 28/07/2009. Disponível em <<http://www.brasilreef.com/viewtopic.php?f=24&t=630>> Acessado em 04/03/2019.
- GOREAU, T. J.; MACFARLANE, A. H. Reduced growth rate of *Montastrea annularis* following the 1987–1988 coral-bleaching event. **Coral reefs**, v. 8, n. 4, p. 211–215, 1990.
- HAAS, B. J., et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature protocols** v. 8, p. 1494–1512, 2013.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser.** v.41, p. 95–8, 1999.
- HALLIN, S.; LINDGREN, P. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 1652-1657, 1999.
- HENDERSON, G. et al. Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework. **PeerJ** v. 7, e6496, 2019.
- HERON, S. F., MAYNARD, J. A., VAN HOOIDONK, R. EAKIN, C. M. Warming trends and bleaching stress of the world's coral reefs 1985–2012. **Sci. Rep.** v. 6, p. 38402, 2016.
- HOEGH-GULDBERG, O., et al. The human imperative of stabilizing global climate change at 1.5° C. **Science.** v. 365, p.1–13, 2019.
- HOOGENBOOM, M. O., ANTHONY, K. R. N., CONNOLLY, S. R. Energetic cost of photoinhibition in corals. **Marine Ecology Progress Series**, v. 313, p.1–1, 2006.
- HORVATH, K. M., et al. Next-century ocean acidification and warming both reduce calcification rate, but only acidification alters skeletal morphology of reef-building coral *Siderastrea siderea*. **Sci. Rep** v. 6, p. 29613, 2016.
- HOWARD, E. C.; J. R. HENRIKSEN, A.; BUCHAN, C. R.; REISCH, H.; BUERGEMANN, et al. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. **Science**, 314, 649–652, 2006.
- HUERTA-CEPAS J., SERRA F., BORK P. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1635-1638, 2016.
- HUGHES, T. P. et al. Coral reefs in the Anthropocene. **Nature**, v. 546, n. 7656, p. 82-90, 2017.
- HUGHES, T. P. et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. **Science**, v. 359, p. 80-83, 2018.
- HYATT, D., CHEN, G. L., LOCASCIO, P. F., LAND, M. L., LARIMER, F. W., HAUSER, L. J. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics.** v. 11, p. 119, 2010.

IPCC. Aqueciemnto de 1,5 °C - Relatório especial do Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC. 2019. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2019/07/SPM-Portuguese-version.pdf> . Acesso em: 12/11/2020.

JASPERS, C. et al. Resolving structure and function of metaorganisms through a holistic framework combining reductionist and integrative approaches. **Zoology**, v. 133, p. 81-87, 2019.

JURY CP, TOONEN RJ. Adaptive responses and local stressor mitigation drive coral resilience in warmer, more acidic oceans. **Proc. R. Soc.** v. 286, 2019.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. Biorefineries—industrial processes and products. **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, v. 5, p. 659-688, 2007.

KANEHISA, M., SATO, Y., MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of molecular biology** v. 428, p. 726–731, 2016.

KANG, D. D., FROULA, J., EGAN, R., WANG, Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. **PeerJ**. v. 3, p. 1165, 2015.

KATOH K., KUMA K.-I. H., T., MIYATA T. Mafft version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research** v. 33, p. 511–518, 2005.

KIKUCHI, R. K. P.; LEÃO, Z. M. A. N.; OLIVEIRA, M. D. M. Conservation status and spatial patterns of AGRRA vitality indices in Southwestern Atlantic reefs. **Revista de Biologia Tropical**, v. 58, p. 1–31, 2010.

KOREN, O.; ROSENBERG, E. Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5254–5259, 2006.

KUFFNER, I. B. et al. Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. **Nature geoscience**, v. 1, n. 2, p. 114, 2008.

KUROKAWA M., KORNBLUTH S. Caspases and Kinases in a Death Grip. **Cell**, v. 138, p. 838-854, 200.

LAJEUNESSE, T. C; PARKINSON, J. E; GABRIELSON, P. W; JEONG, H. J; REIMER, J. D; VOOLSTRA, C. R; SANTOS, S. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. **Current Biology**, v. 28, p. 2570-2580, 2018.

LANGER, M. R.; SILK, M. T.; LIPPS, J. H. Global ocean carbonate and carbon dioxide production; the role of reef Foraminifera. **The Journal of foraminiferal research**, v. 27, n. 4, p. 271–277, 1997.

LANGMEAD, B., STEVEN L. S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, p. 357, 2012.

LE NOHAÏC, M., et al. Marine heatwave causes unprecedented regional mass bleaching of thermally resistant corals in northwestern Australia. **Scientific reports**. v. 7, p. 14999, 2017.

LEÃO, Z. M. A. M. et al. Brazilian coral reefs in a period of global change : A synthesis. **ReBentos**, v. 64, n. 2, p. 97–116, 2016.

LEÃO, Z.M.A.N., KIKUCHI R.K.P. A relic coral fauna threatened by global changes and human activities, Eastern Brazil. **Mar Pollut Bull**, v. 51, p. 599–611, 2005.

LENTH, R. V. Least-Squares Means: R. **Package lsmmeans**, v. 69, p. 33, 2016.

LESSER, M. P. et al. Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. **Coral reefs**, v. 8, p. 225-232, 1990.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annu. Rev. Physiol.** v. 68, p. 253–278, 2006.

LEVIN, R. A., et al. Sex, Scavengers, and Chaperones: Transcriptome Secrets of Divergent Symbiodinium Thermal Tolerances. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, p. 2201–2215, 2016.

LI, H., et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2078-2079, 2009.

LITTMAN, R., WILLIS, B. L., BOURNE, D. G. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. **Environ. Microbiol. Rep.**v. 3, p. 651–660, 2011.

LOVE M.I., HUBER W., ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology** v. 15, p. 550, 2014.

MASELLA, A. P., BARTRAM, A. K., TRUSZKOWSKI, J. M., BROWN, D. G., NEUFELD, J. D. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC bioinformatics**. v. 13, p. 31, 2012.

MCMURDIE, P.J., HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, p. 61217, 2013.

MIDDLEBROOK R., HOEGH-GULDBERG O., LEGGAT W. The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. **J Exp Biol**, v. 211, p. 1050–1056, 2008.

MILLER, C. S., BAKER, B. J., THOMAS, B. C., SINGER, S. W., BANFIELD, J. F. EMIRGE : reconstruction of full-length ribosomal genes from microbial community short read sequencing data. **Genome Biology** v.12, p. 2-14, 2011.

- MIURA, N. et al. *Ruegeria sp.* strains isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis* inhibit growth of the temperature-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Marine Biotechnology** v. 21, p. 1-8, 2019.
- MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological economics**, v. 29, p. 215–233, 1999.
- MODOLON, F., BARNO, A. R., VILLELA H. D. M., PEIXOTO, R. S. Ecological and biotechnological importance of secondary metabolites produced by coral-associated bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p.1441—1457, 2020.
- MORGAN, K.M., PERRY, C.T., JOHNSON, J.A., SMITHERS, S.G. Nearshore turbid-zone corals exhibit high bleaching tolerance on the Great Barrier Reef following the 2016 ocean warming event. **Front. Mar. Sci.**, 2017.
- MORGANS, C.A. et al. Symbiodiniaceae probiotics for use in bleaching recovery. **Restoration Ecology**, v. 28, p. 282-288, 2020.
- MORIKAWA, M. K., PALUMBI, S. R. Using naturally occurring climate resilient corals to construct bleaching-resistant nurseries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, p. 10586–10591, 2019.
- MOURA R.L. Brazilian reefs as priority areas for biodiversity conservation in the Atlantic Ocean. **Proc 9th Int Coral Reef Symp** v. 2, 917–920, 2002.
- MULLER-PARKER, G.; D'ELIA, C. F.; COOK, C. B. Interactions between corals and their symbiotic algae. In: Birkeland C. (eds) *Coral reefs in the Anthropocene*. **Springer**, Dordrecht, p. 99–116. 2015.
- MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, **27**, 454-460 (1977).
- NASEM. *A Research Review of Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs*. (National Academies Press, 2018).
- National Academies of Science, Engineering and Medicine (2019). *A Decision Framework for Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs*. Washington, DC. The National Academies Press.
- NUNES, F., FUKAMI, H., VOLLMER, S.V., NORRIS, R.D., KNOWLTON, N. Re-evaluation of the systematics of the endemic corals of Brazil by molecular data. **Coral Reefs**, v. 27, p. 423–432, 2008.
- OAKLEY, C. A., DAVY, S. K. Cell Biology of Coral Bleaching. (In): *Coral Bleaching*. (Springer, Cham, 2018)
- OKSANEN J. et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

PALUMBI, S. R., BARSHIS, D. J., TRAYLOR-KNOWLES, N., BAY, R. A. Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. **Science**, v. 344, p. 895–898, 2014.

PANDEY P., BISHT S., SOOD A., AERON A., SHARMA G.D., MAHESHWARI D.K. (2012) Consortium of plant growth-promoting-bacteria: future perspectives in agriculture. In: Maheshwari D.K. (ed) *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics*. Springer, Berlin, pp 185–200.

PANDOLFI, J. M. et al. Projecting Coral Reef Futures Under Global Warming and Ocean Acidification. **Science**, v. 333, p. 418–422, 2011.

PANDOLFI, J. M. Global Trajectories of the Long-Term Decline of Coral Reef. **Science**, v. 955, p. 10–14, 2003.

PARKS, D. H. et al. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature microbiology**. v. 2, p.1533, 2017.

PEIXOTO et al., (2021)

PEIXOTO, R. S. et al. Beneficial microorganisms for corals (BMC): proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 341, 2017.

PEIXOTO, R. S.; SWEET, M.; BOURNE, D. G. Customized medicine for corals. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p.686, 2019.

PICCIANI, N. et al. Geographic patterns of Symbiodinium diversity associated with the coral *Mussismilia hispida* (Cnidaria, Scleractinia) correlate with major reef regions in the Southwestern Atlantic Ocean. **Marine Biology**, v. 163, n. 11, 2016.

POLY, F.; MONROZIER, L.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Micro.**, v. 152, p. 95-103, 2001.

POOTAKHAM, W. et al. Heat-induced shift in coral microbiome reveals several members of the Rhodobacteraceae family as indicator species for thermal stress in *Porites lutea*. **Microbiology Open**, v. 12, p. 935, 2019.

POTVIN, C.; ROFF, D.A. Distribution-free and robust statistical methods: viable alternatives to parametric statistics. **Ecology**, v. 74, p. 1617-1628, 1993.

RADECKER et al 2020

RAINA, J.B. et al. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. **PeerJ**, v. 4, e2275, 2016.

RAINA, J.B. et al. Subcellular tracking reveals the location of dimethylsulfoniopropionate in microalgae and visualises its uptake by marine bacteria. **Elife**, v. 6, e23008, 2017.

- RAINA, JB., TAPIOLAS, D., FORÉT, S. et al. DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. **Nature**, v. 502, p. 677–680, 2013.
- REAKA-KUDLA, M.L.,. Known and unknown biodiversity, risk of extinction and conservation strategy in the sea. **Waters in Peril**, p. 19–33. 2001.
- REN, J., AHLGREN, N. A., LU, Y. Y., FUHRMAN, J. A., SUN, F. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. **Microbiome**, v. 5, p. 69, 2017.
- RESHEF, L., KOREN, O., LOYA, Y., ZILBER-ROSENBERG, I. ROSENBERG, E. The coral probiotic hypothesis. **Environ. Microbiol**, 8, 2068–2073, 2006.
- RIES, J. B.; COHEN, A. L.; MCCORKLE, D. C. Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. **Geology**, v. 37, n. 12, p. 1131–1134, 2009.
- RITSON-WILLIAMS, R., GATES, R.D. Coral community resilience to successive years of bleaching in Kane‘ohe Bay, Hawai‘i. **Coral Reefs**, v. 39, p. 757–769, 2020.
- ROBBINS, S.J., et al. A genomic view of the reef-building coral *Porites lutea* and its microbial symbionts. **Nat Microbiol**, v. 4, p. 2090–2100, 2019.
- ROBINETTE, S.L. et al. Hierarchical alignment and full resolution pattern recognition of 2D NMR spectra: application to nematode chemical ecology. **Anal. Chem.** v. 83, p. 1649–1657, 2011.
- ROBINSON M.D., MCCARTHY D.J., SMYTH G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010.
- ROHWER, F. *et al.* Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine ecology Progress Series**, v. 243, p. 1–10, 2002.
- ROSADO, P.M., et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. **ISME J** v. 13, p. 921–936, 2019.
- ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. May, p. 355–362, 2007.
- ROSENBERG, E.; FALKOVITZ, L. The *Vibrio shiloi* / *Oculina patagonica* Model System of Coral Bleaching. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 143–159, 2004.
- ROUX, S., ENAULT, F., HURWITZ, B. L., SULLIVAN, M. B. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. **PeerJ**. v.3, 2015.
- RUDOLPH, N.; LABUSCHAGNE, N.; AVELING, T. A. S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling growth of maize. **Seed science and technology**, v. 43, n. 3, p. 507-518, 2015.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D.; FOX, R. S. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Ed. Roca, 2005.

SANTOS, H. F. *et al.* Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

SANTOS, H.F., CARMO, F.L., PAES, J.E.S. *et al.* Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water Air Soil Pollut**, v. 216, p. 329–350, 2011.

SCHREIBER, U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds), **Advances in Photosynthesis and Respiration**. Springer The Netherlands. p. 279–319. 2004

SHIN, D. *et al.* Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs. **PloS one**, v. 14, e0220843, 2019.

SIEBECK, U. E., MARSHALL, N. J., KLÜTER, A., HOEGH-GULDBERG, O. Monitoring coral bleaching using a colour reference card. **Coral Reefs** v. 25, p. 453–460, 2006.

SIEBER, C.. (2017, March 1). Dereplication, Aggregation and Scoring Tool (DAS Tool) v1.0 (Version 00) [Computer software]. <https://www.osti.gov//servlets/purl/1345357>.

SILVA, D. P., *et al.* Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals. **Ecology and Evolution**, v. 9, p. 5172–5185, 2019.

SOARES, M. DE O.; RABELO, E. F. Primeiro registro de branqueamento de corais no litoral do Ceará (NE, Brasil): Indicador das mudanças climáticas? **Geociencias**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2014.

STEFELS, J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. **J. Sea Res**, v. 43, p.183–197, 2000.

SWEET, M., *et al.* Compositional homogeneity in the pathobiome of a new, slow-spreading coral disease. **Microbiome**, v. 7, p. 139, 2019.

SWEET, M.J., BROWN, B.E., DUNNE, R.P. *et al.* Evidence for rapid, tide-related shifts in the microbiome of the coral *Coelastrea aspera*. **Coral Reefs**, v. 36, p. 815–828, 2017.

TAKAHASHI, S., BAUWE, H., BADGER, M.R. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 144, p. 487–94, 2007.

TAKAHASHI, S., NAKAMURA, T., SAKAMIZU, M., WOESIK, R. V., YAMASAKI, H. Repair Machinery of Symbiotic Photosynthesis as the Primary Target of Heat Stress for Reef- Building Corals. **Plant and Cell Physiology**. v. 45, p. 251–255, 2004.

TEIXEIRA C.D., *et al.* Sustained mass coral bleaching (2016–2017) in Brazilian turbid-zone reefs: taxonomic, cross-shelf and habitat-related trends. **Coral Reefs** v. 38, p. 801–813, 2019.

VALLINA, S. M.; SIMO, R. Strong relationship between DMS and the solar radiation dose over the global surface ocean. **Science**, v. 315, p. 506–508, 2007.

van OPPEN, M. J. H. *et al.* Building coral reef resilience through assisted evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 8, p. 2307-2313, 2015.

van OPPEN, M. J. H. *et al.* Shifting paradigms in restoration of the world' s coral reefs. **Global Change Biology**, v. 23, p. 1–12, 2017.

van OPPEN, M.J.H., BLACKALL, L.L. Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, p. 557–567, 2019.

van WOESIK R., *et al.* Climate-change refugia in the sheltered bays of Palau: analogs of future reefs. **Ecology and Evolution**, v. 2, p. 2474–2484, 2012.

VARALJAY, V.; HOWARD, E.; SUN, S.; MORAN, M. Deep sequencing of a dimethylsulfoniopropionate-degrading gene (*dmdA*) by using PCR primer pairs designed on the basis of marine metagenomic data. **App. Envir. Micro.**, v. 76, p. 609-617, 2010.

VERON, J. E. N. Corals of the World, Volumes 1–3. Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia, 2000.

VIDAL-DUPIOL J., *et al* Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. **J Exp Biol**. 214, 1533–45, 2011.

VIDAL-DUPIOL J., *et al.* Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. **J Biol Chem**. v. 286, p. 22688–98, 2011.

VILLELA, H. Microbiome Flexibility Provides New Perspectives in Coral Research. **Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, p. e2000088-e2000088, 2020.

VOOLSTRA, C. R.; ZIEGLER, M. Adapting with microbial help: microbiome flexibility facilitates rapid responses to environmental change. **BioEssays**, v. 42, p. 2000004, 2020.

Wangpraseurt, D., *et al.* In vivo Microscale Measurements of Light and Photosynthesis during Coral Bleaching: Evidence for the Optical Feedback Loop? **Frontiers in microbiology.**, v. 8, p. 59, 2017.

WATERHOUSE, R. M., *et al.* BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. **Molecular biology and evolution**. v. 35, p. 543-548, 2017.

WATERS, C. N. *et al.* The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**, v. 351, p.2622, 2016.

WEBSTER, N. S.; REUSCH, T. B.H. Microbial contributions to the persistence of coral reefs. **The ISME journal**, 11, 2167-2174, 2017.

WEIS, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p.3059–3066, 2008.

WEST, P. T., PROBST, A. J., GRIGORIEV, I. V, THOMAS, B. C., BANFIELD, J. F. Genome-reconstruction for eukaryotes from complex natural microbial communities. **Genome research**, v. 28, p.569-580, 2018.

WICKHAM, H. ggplot2. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Computational Statistics**, v. 3, p.180-185, 2011.

WICKHAM, H., FRANCOIS, R., HENRY, L., MÜLLER, K. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R Package Version 0.7.3, 2017.

WILLIAMS et al. (2015)

WIRTH, J.S. et al. Dimethylsulfoniopropionate Sulfur and Methyl Carbon Assimilation in *Ruegeria* Species. **Mbio**, v. 11, p. 2, 2020.

WOOD-CHARLSON, E. M., WEYNBERG, K. D., SUTTLE, C. A., ROUX, S. & OPPEN, M. J. H. Metagenomic characterization of viral communities in corals: mining biological signal from methodological noise. **Environ. Microbiol.**, v. 17, p. 3440–3449, 2015.

WU, Y., SIMMONS, B. A., SINGER, S. W. MaxBin 2 . 0 : an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics Advance**. 1–2, 2015.

YELLOWLEES, D.; REES, T. A. V; LEGGAT, W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 679–694, 2008.

ZANEVELD, J. R., MCMINDS, R., THURBER, R. V. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. **Nature microbiology**, v. 2, p. 1-8, 2017.

ZIEGLER, M. et al. Coral bacterial community structure responds to environmental change in a host-specific manner. **Nature communications**, v. 10, o. 1-11, 2019.

ZIEGLER, M., SENECA, F. O., YUM, L. K., PALUMBI, S. R. & VOOLSTRA, C. R. Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. **Nat. Commun.** v. 8, p. 14213, 2017.

8. ANEXO I: PATENTE DEPOSITADA

Pré-requisito para defesa: autoria em patente depositada

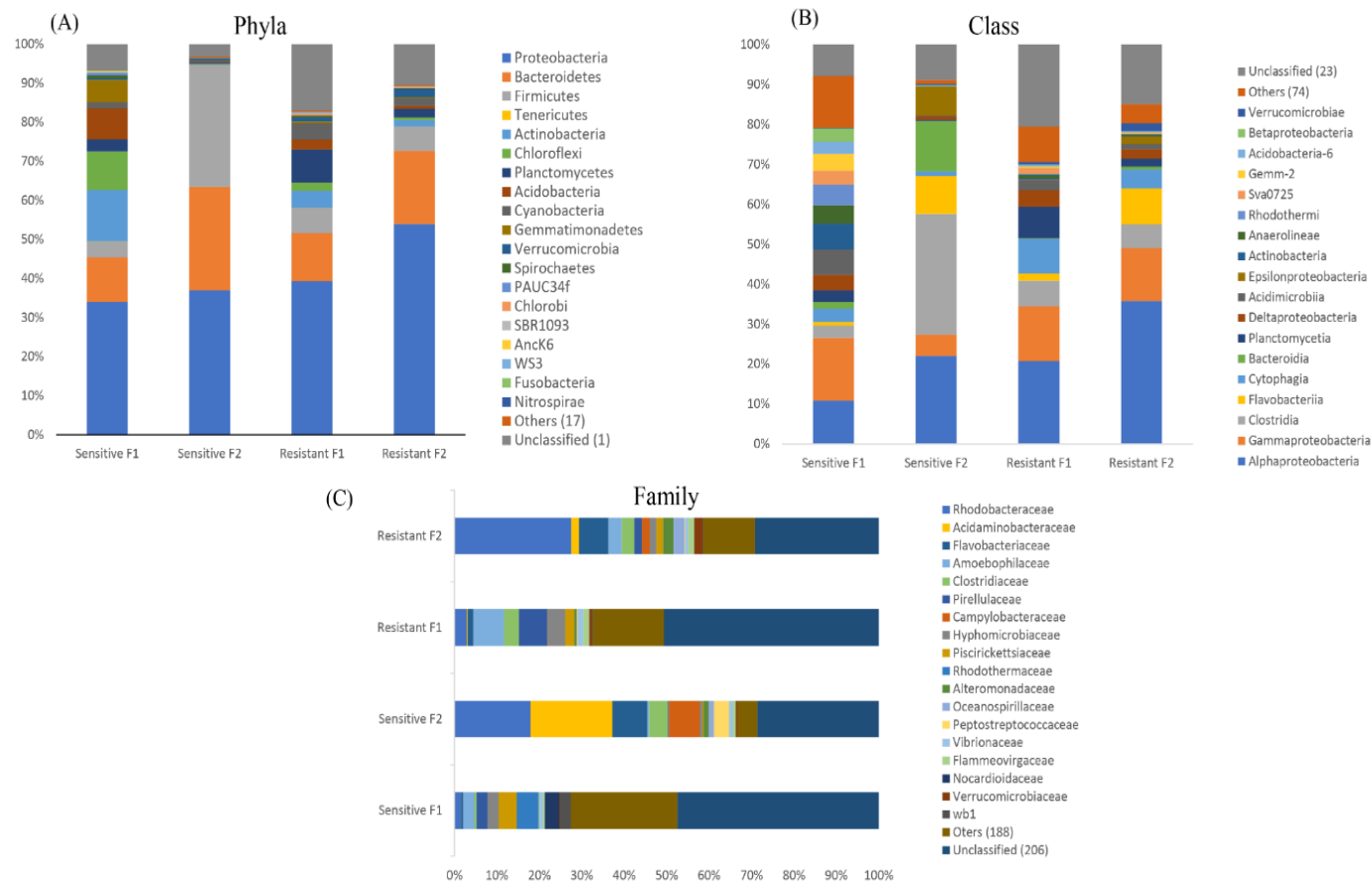
(Apresentada para banca - confidencial)

9. ANEXO II: MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO I

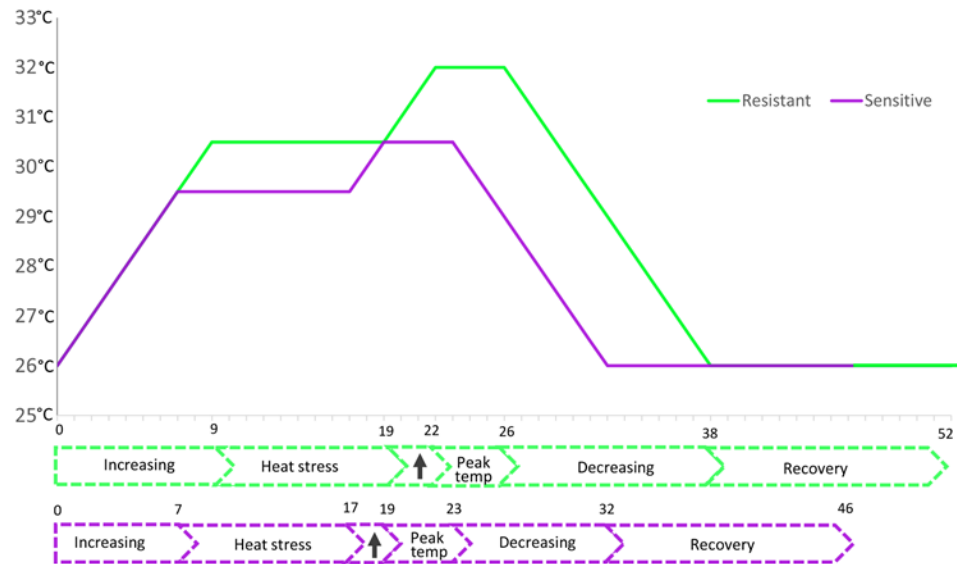
Figuras e tabelas suplementares Capítulo I da tese

As tabelas suplementares 6, 7 e 8 seguem anexadas em formato excel.

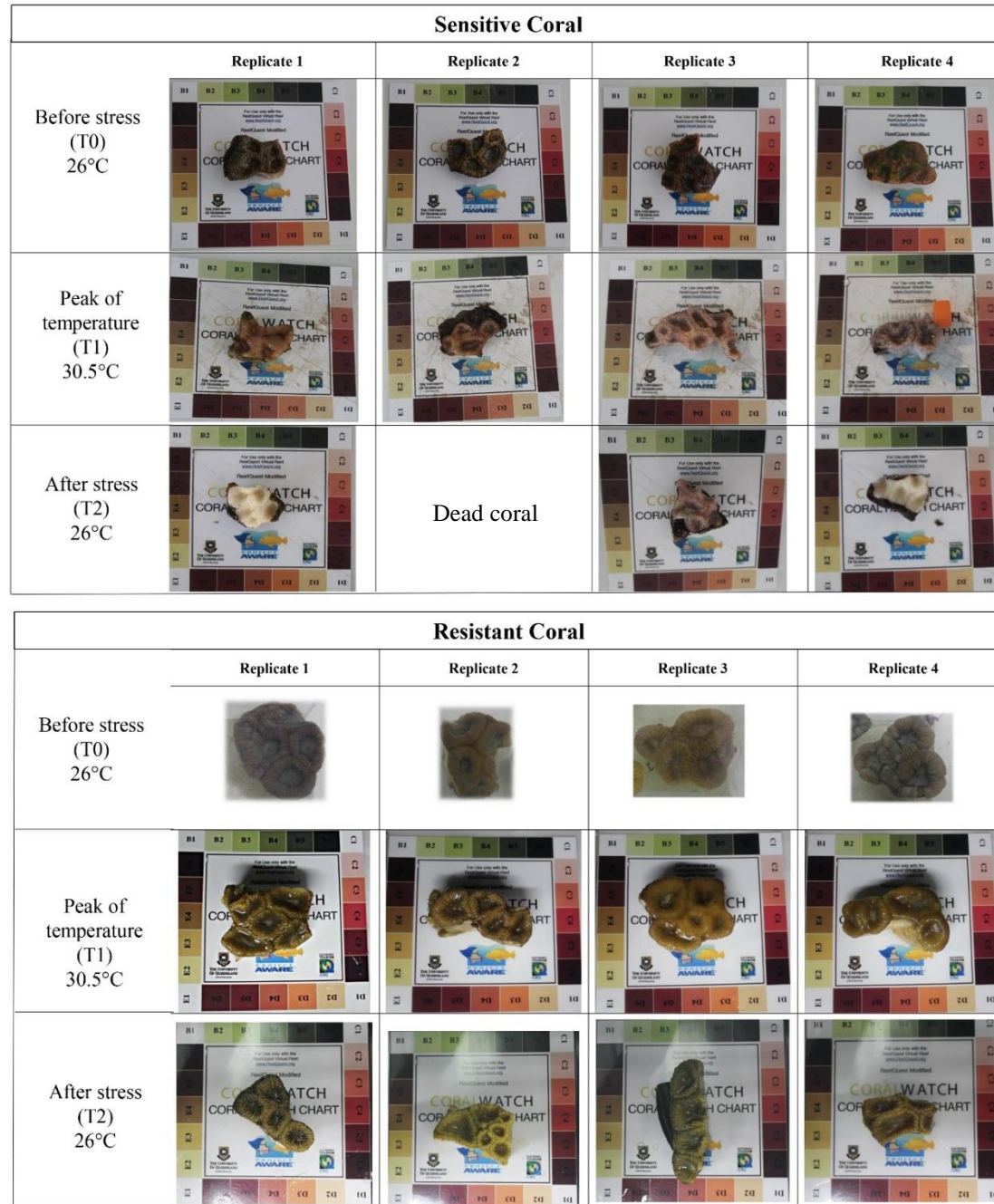
Supplementary figure 1: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundance of Resistant and Sensitive corals during the 2015/2016 mass bleaching event on July 3rd, 2016 (F1) and one month after (F2).



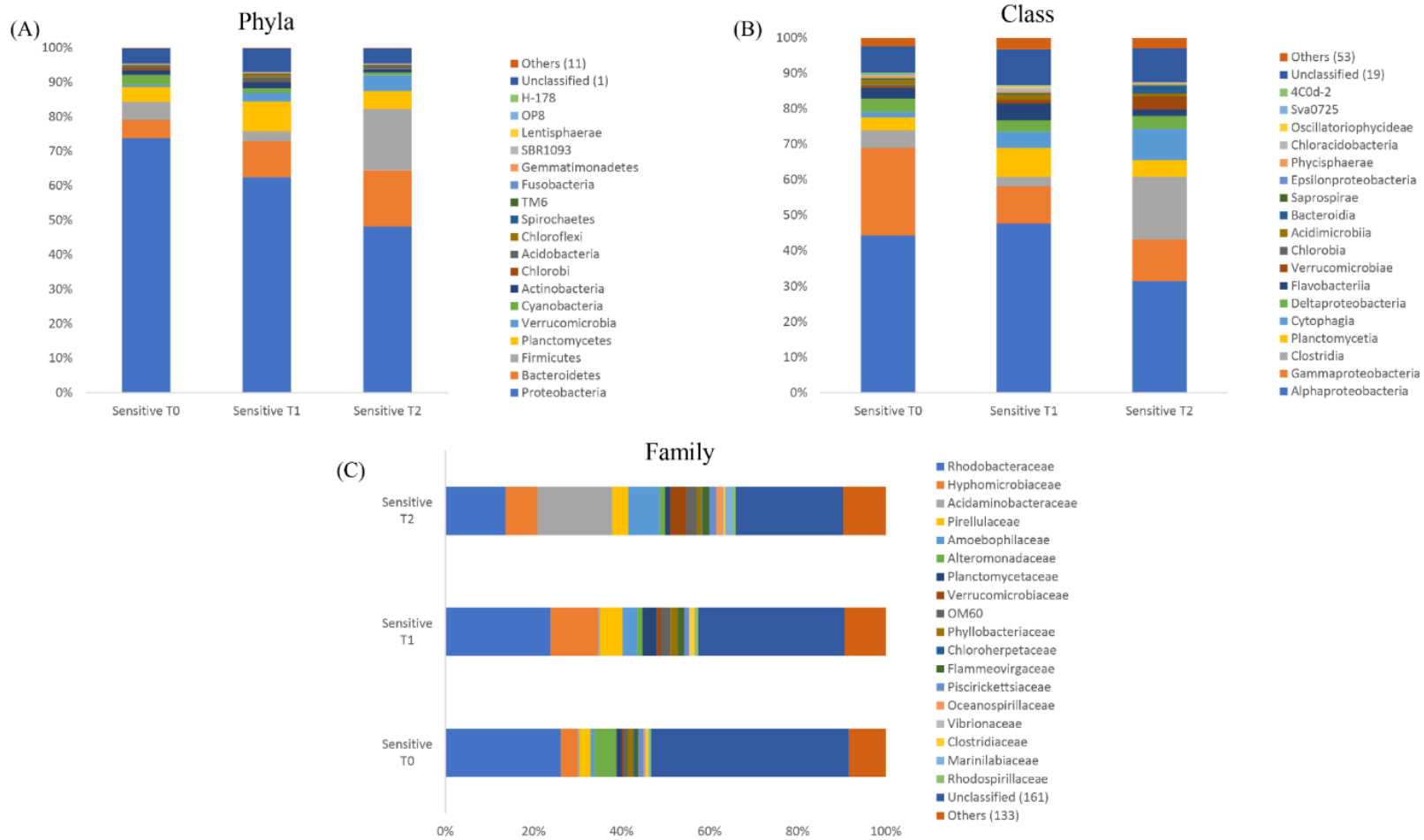
Supplementary figure 2: Mesocosm experimental design with heat pulse stress regimes for Thermal Resistant (green) and Thermal Sensitive (purple) corals showing the temperature (axis x) by day (axis y).



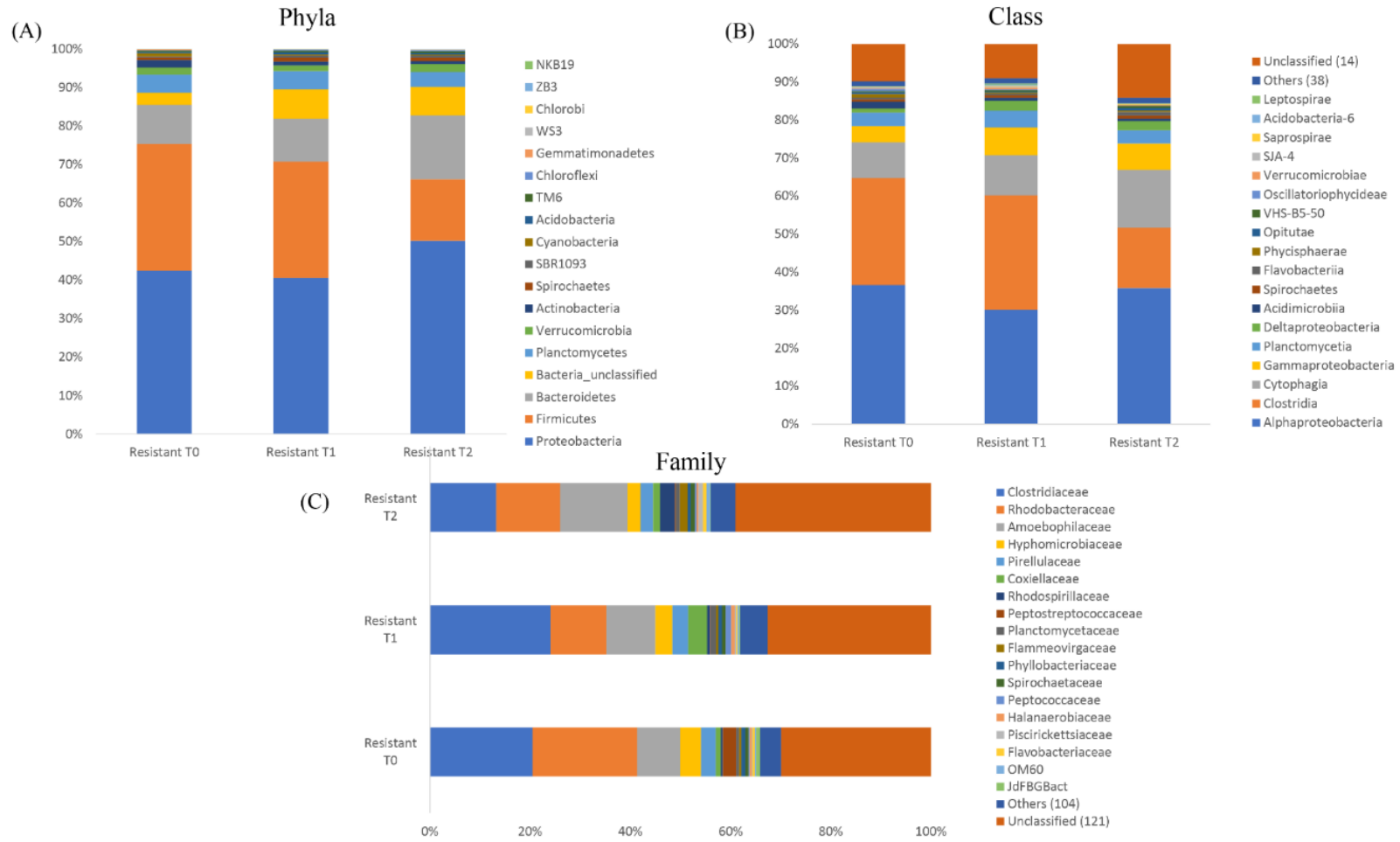
Supplementary Figure 3: Thermal resistant and sensitive coral fragments collected before stress (T0), during stress (T1) and after stress (T2).



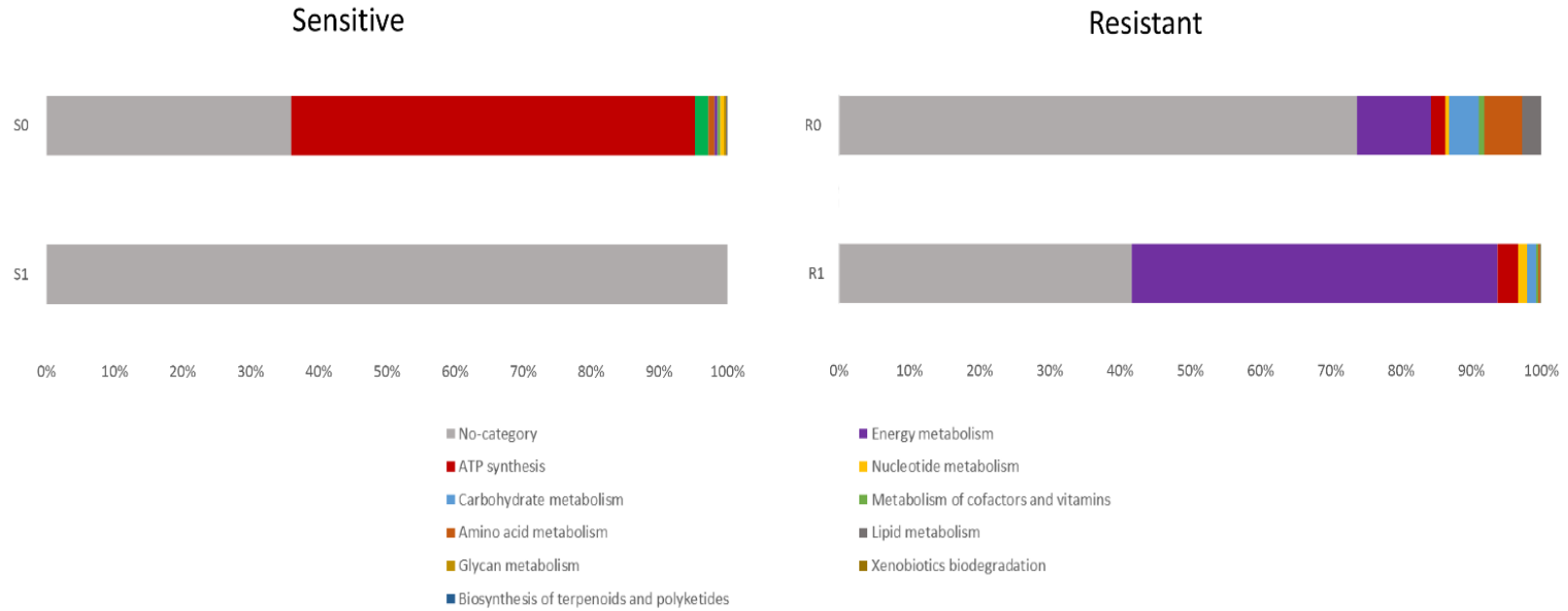
Supplementary Figure 4: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundances of Thermal Sensitive corals at the beginning of the experiment (T0) after the peak of temperature (T1) and after the recovery period (T2).



Supplementary figure 5: Phyla (A), Class (B) and Family (C) relative abundance of Thermal Resistant corals at the beginning of experiment (T0) after the peak of temperature (T1) and after the recovery period (T2).



Supplementary figure 6: Relative abundance from main KEGG categories mapped from ORFs from Thermal Sensitive corals and Thermal Resistant corals before the thermal stress (S0 and R0) and during the peak of temperature (S1 and R1).



Supplementary Table 1: Indicator taxa for Thermal Resistant or Thermal Sensitive corals from field samples sorted by phenotype.

OTU ID	Taxonomic Identification					Indicator stress	Indicator value (IV)	p value
	Phyla	Class	Order	Family	Genus			
OTU 191	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Marinicellales	Marinicellaceae		Resistant	95.2	0.0022
OTU 177	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		Resistant	91.2	0.0044
OTU 071	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Inquilinus	Resistant	87.3	0.011
OTU 164	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	OM60		Resistant	86.9	0.003
OTU 124	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae		Resistant	83.2	0.0086
OTU 104	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				Resistant	82.5	0.0156
OTU 106	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales			Resistant	81.7	0.0062
OTU 271	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales			Resistant	81.6	0.005
OTU 015	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		Resistant	81.3	0.0058
OTU 088	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		Resistant	80.8	0.0026
OTU 218	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	JdFBGBact		Resistant	80	0.0218
OTU 131	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				Resistant	79.4	0.0414
OTU 111	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Spongiibacter	Resistant	79.2	0.0198
OUT 185	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Photobacterium	Resistant	78.6	0.0138
OTU 082	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae		Resistant	77.3	0.0122
OTU 160	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Lutimonas	Resistant	75.4	0.017
OTU 217	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiohalorhabdales			Resistant	75.4	0.0348
OTU 048	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae		Resistant	74.4	0.036
OTU 028	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				Resistant	74	0.0222
OTU 376	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		Resistant	70.9	0.022
OTU 070	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae		Resistant	66.1	0.0152
OTU 034	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		Resistant	65.6	0.014
OTU 063	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		Resistant	65.3	0.0214

Supplementary Table 2: Indicator taxa from field samples sorted by collecting time during the 2015/2016 mass bleaching event on July 3rd, 2016 (F1) or one month after (F2).

OTU ID	Taxonomic Identification					Indicator stress	Indicator value (IV)	p value
	Phyla	Class	Order	Family	Genus			
OTU 003	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	WH1-8	F2	100	0.001
OTU 012	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae		F2	100	0.001
OTU 052	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	WH1-8	F2	100	0.001
OTU 108	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae		F2	100	0.001
OTU 197	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae		F2	100	0.001
OTU 208	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae		F2	100	0.001
OTU 027	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		F2	99.9	0.001
OTU 063	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	99.9	0.001
OTU 070	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae		F2	99.9	0.001
OTU 140	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	WH1-8	F2	99.7	0.001
OTU 038	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae		F2	99.5	0.001
OTU 130	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Ferrimonadaceae	Ferrimonas	F2	99.4	0.001
OTU 011	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		F2	99.3	0.001
OTU 135	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Amphritea	F2	99.3	0.001
OTU 111	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Spongiibacter	F2	99	0.001
OTU 049	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		F2	98.9	0.001
OTU 008	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	98.7	0.001
OTU 053	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas	F2	98.7	0.001
OTU 016	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	98.4	0.001
OTU 059	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	F2	98	0.001
OTU 080	Proteobacteria					F2	97.4	0.0016
OTU 020	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	97.1	0.001
OTU 136	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Tenacibaculum	F2	97.1	0.0014
OTU 001	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	96.8	0.001
OTU 013	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales			F1	95.5	0.039
OTU 105	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Photobacterium	F1	95.5	0.0022
OTU 034	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		F2	93.7	0.0012
OTU 015	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	93.4	0.001
OTU 060	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	F2	88.4	0.001
OTU 041	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ruegeria	F2	87.6	0.0054
OTU 006	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			F2	87.5	0.0042
OTU 042	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			F2	87.5	0.0028
OTU 066	Cyanobacteria	ML635J-21				F2	87.5	0.0026
OTU 093	Bacteroidetes					F2	87.5	0.0028
OTU 149	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	Persicobacter	F2	87.5	0.0032
OTU 055	Firmicutes					F2	86.7	0.0072
OTU 096	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			F2	86.3	0.006
OTU 030	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	86.1	0.0026
OTU 179	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales			F1	85.9	0.0078
OTU 002	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	Fusibacter	F2	85.7	0.004

OTU 007	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae		F2	84.7	0.0234
OTU 089	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	Fusibacter	F2	84.7	0.0066
OTU 019	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		F1	84.5	0.0028
OTU 061	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Cohaesibacteraceae	Cohaesibacter	F2	84.5	0.0054
OTU 115	Cyanobacteria	Synechococcophycideae	Synechococcales	Synechococcaceae		F1	84.4	0.0038
OTU 244	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Erythrobacter	F2	83.8	0.0048
OTU 017	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Tepidibacter	F2	83.7	0.0058
OTU 300	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Amoebophilaceae		F1	82	0.04
OTU 160	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Lutimonas	F2	81	0.0012
OTU 039	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		F1	80.3	0.0068
OTU 005	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	80.2	0.006
OTU 388	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Owenweeksia	F1	80.1	0.016
OTU 022	Gemmatimonadetes	Gemm-4				F1	79.3	0.0108
OTU 214	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae		F1	78.5	0.033
OTU 085	Bacteroidetes					F2	75	0.007
OTU 118	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	F2	75	0.0126
OTU 143	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			F2	75	0.0046
OTU 207	p_Unclassified					F2	75	0.0046
OTU 106	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales			F1	71.7	0.0452
OTU 023	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	71.5	0.0496
OTU 114	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			F2	68.9	0.026
OTU 025	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae		F2	68.4	0.0448
OTU 144	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			F2	62.5	0.0156
OTU 148	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		F2	62.5	0.0176
OTU 192	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae		F2	62.5	0.0156

Supplementary Table 3: Indicator taxa of Thermal Sensitive corals in mesocosm experiment sorted by the beginning of experiment (0), the peak of temperature (1) or/and after recovery period (2).

OTU ID	Taxonomic Identification					Indicator stress	Indicator value (IV)	p value
	Phyla	Class	Order	Family	Genus			
OTU 632	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Luteolibacter	1	100	0.0278
OTU 585	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	100	0.0278
OTU 570	Proteobacteria	TA18	CV90			1	92.7	0.0278
OTU 403	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomyces	1	99.1	0.0278
OTU 379	Bacteria_unclassified					1	70.6	0.0278
OTU 372	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae		1	96	0.0278
OTU 365	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales			1	94	0.0162
OTU 365	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales			0	91.2	0.0134
OTU 333	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0	93.4	0.0278
OTU 333	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				1	91.8	0.031
OTU 333	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0	99.4	0.0144
OTU 016	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1 and 2	92.4 and 93.3	0.02 and 0.01
OTU 326	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales			1	91.5	0.0178
OTU 326	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales			0	94.4	0.014
OTU 317	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	78.9	0.015
OTU 034	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		2	90.8	0.0376
OTU 310	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		1	80.7	0.0236
OTU 020	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		2	84.3	0.0256
OTU 309	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae		0	90	0.0434
OTU 291	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0	96.1	0.0278
OTU 291	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0	98.4	0.014
OTU 279	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0	90.6	0.0278
OTU 279	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0	97.3	0.014
OTU 260	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomyces	1	77.3	0.0488
OTU 256	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Phaeobacter	0	88.4	0.0144
OTU 249	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiohalorhabdadales			0	97.8	0.014
OTU 247	Verrucomicrobia					1	99.2	0.0278
OTU 246	Proteobacteria	Gammaproteobacteria				1	95.9	0.0278
OTU 294	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	100	0.01
OTU 406	Bacteria_unclassified					2	100	0.0064
OTU 505	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				2	100	0.01
OTU 236	Proteobacteria	Gammaproteobacteria				0	98.7	0.0246
OTU 225	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			0	92.9	0.0232
OTU 224	Verrucomicrobia					1	90.8	0.0278
OTU 198	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae		0	98.7	0.0278
OTU 035	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Roseivivax	2	99.3	0.0064
OTU 198	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae		0	99.5	0.014
OTU 193	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Aquimarina	0	89.7	0.0216

OTU 034	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		2	98.1	0.0064
OTU 247	Verrucomicrobia					2	97.9	0.0236
OTU 190	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	BD7-3			1	80.5	0.0326
OTU 083	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		2	97.4	0.0064
OTU 190	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	BD7-3			0	88.9	0.014
OTU 060	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	2	96	0.038
OTU 183	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		1	93.3	0.031
OTU 266	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	OM60		2	95.9	0.0334
OTU 183	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		1	91.3	0.0278
OTU 246	Proteobacteria	Gammaproteobacteria				2	94.6	0.0228
OTU 177	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	78	0.047
OTU 175	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0	81	0.0144
OTU 174	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	JdFBGBact		1	80.2	0.0494
OTU 13	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales			0	98.1	0.0278
OTU 101	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Spirobacillales			0	99.8	0.0218
OTU 083	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		1	97.3	0.0278
OTU 030	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0 and 1	93.9 and 87.3	0.01 and 0.01
OTU 023	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1	75	0.022
OTU 019	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		1	83.7	0.0278
OTU 585	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		2	80	0.0472
OTU 008	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0	94.8	0.0152
OTU 005	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0 and 1	84.1 and 79.4	0.01 and 0.01

Supplementary Table 4: Indicator taxa of Thermal Resistant corals in mesocosm experiment sorted by the beginning of experiment (0), the peak of temperature (1) and after recovery period (2).

OTU ID	Taxonomic Identification						Indicator stress	Indicator value (IV)	p value
	Kingdom	Phyla	Class	Order	Family	Genus			
OTU 001	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1	82.1	0.0290
OTU 016	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1	81.0	0.0314
OTU 019	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		1 and 2	72.8 and 80.7	0.0870 and 0.0858
OTU 048	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae		1	78.1	0.0900
OTU 065	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			1 and 2	79.1 and 91.1	0.0586 and 0.0290
OTU 071	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Inquilinus	2	93.8	0.0552
OTU 106	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales			2	82.5	0.0844
OTU 113	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			2	83.1	0.0574
OTU 132	Bacteria						1 and 2	99.3 and 70.2	0.0314 and 0.0844
OTU 163	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			2	93.6	0.0554
OTU 177	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	93.1	0.0314
OTU 188	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae		1	100.0	0.0314
OTU 199	Bacteria						2	84.4	0.3529
OTU 242	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	76.3	0.0546
OTU 245	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	Hyphomonas	1	96.9	0.0290
OTU 254	Bacteria						1	71.9	0.0818
OTU 258	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Nisaea	1	84.8	0.0290
OTU 259	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		2	74.4	0.0840
OTU 261	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomyces	1	85.7	0.0834
OTU 274	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0	71.9	0.0314
OTU 294	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		0	86.5	0.0888
OTU 306	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				2	93.1	0.0574
OTU 317	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	92.3	0.0290
OTU 366	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	91.4	0.0554
OTU 386	Bacteria	Proteobacteria					2	97.5	0.0554
OTU 520	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae		1	97.7	0.0584
OTU 529	Bacteria						1	100.0	0.0314
OTU 535	Bacteria	Verrucomicrobia	Opitutae				2	98.9	0.0552
OTU 555	Bacteria						1	100.0	0.0314
OTU 565	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	100.0	0.0290
OTU 587	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales			1	100.0	0.0314
OTU 605	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				1	88.4	0.0290
OTU 622	Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		1	100.0	0.0290
OTU 650	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				2	100.0	0.0290
OTU 707	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	91.3	0.0580
OTU 712	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae		1	87.1	0.0586
OTU 861	Bacteria	Spirochaetes	Leptospirae	Leptospirales	Leptospiraceae	Leptonema	1	89.2	0.0838
OUT 1181	Bacteria						1	100.0	0.0314

Supplementary table 5: Ratios of Virus, Prokaryotes and Eukaryotes reads for each metagenomic sample.

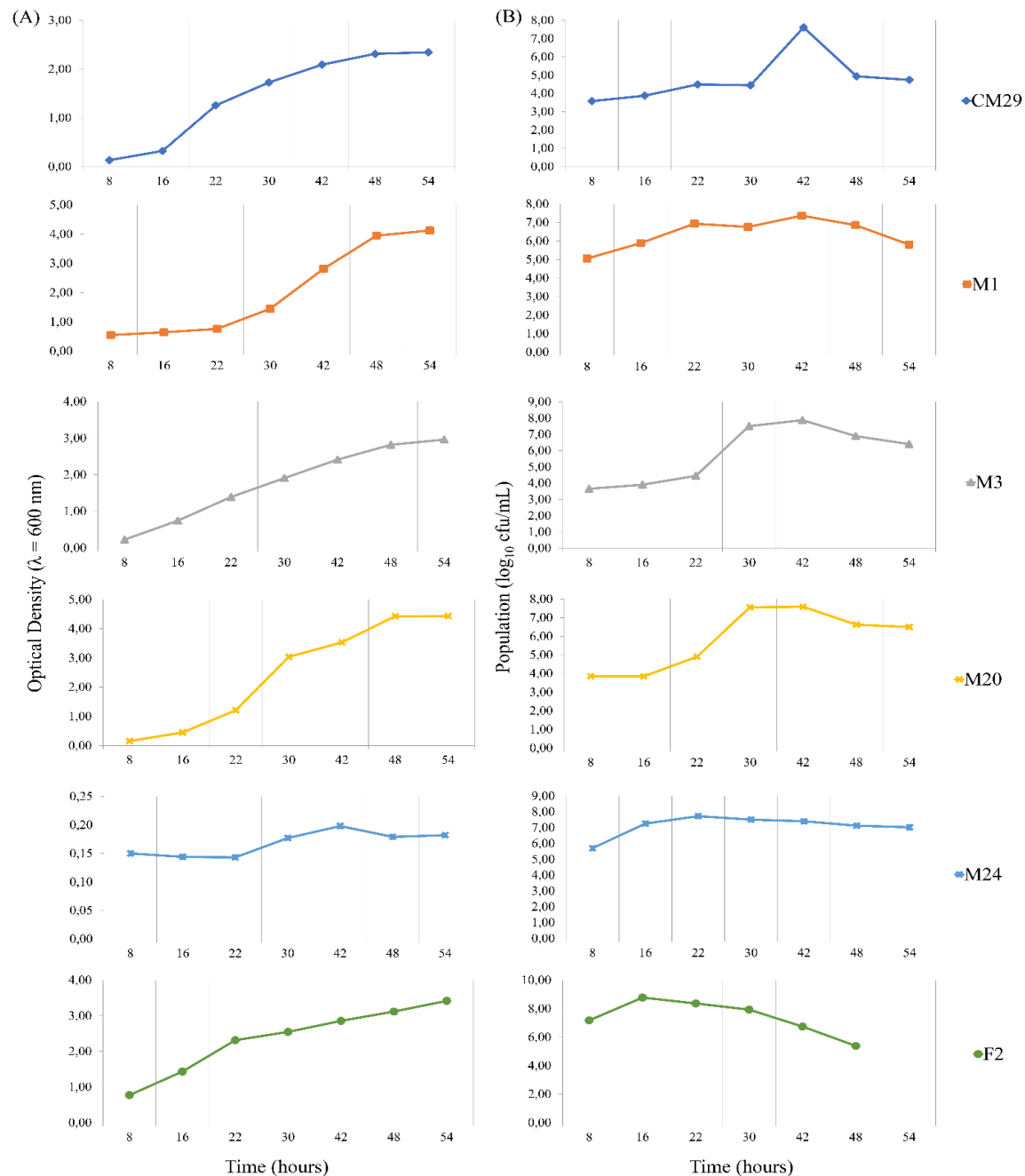
Sample code	Treatment	sampling time	reads	Mapped to Eukaryote (%)	Mapped to Prokaryote (%)	Virus (%)
EM5	Sensitive	T0	18527655	49,81	34,55	15,65
EM6	Sensitive	T0	15731842	49,13	32,46	18,41
EM7	Sensitive	T0	4787725	50,75	29,53	19,72
EM9	Sensitive	T1	18191143	56,96	35,27	7,77
EM10	Sensitive	T1	18273386	54,29	35,14	10,57
EM11	Sensitive	T1	19833916	40,33	40,38	19,30
EM20	Resistant	T0	10954241	44,78	36,89	18,33
EM22	Resistant	T0	9378921	50,47	35,09	14,44
EM23	Resistant	T0	12866261	43,50	36,70	19,80
EM25	Resistant	T1	12864019	37,92	38,83	23,26
EM26	Resistant	T1	10928400	36,98	38,48	24,53
EM27	Resistant	T1	630938	40,11	36,57	23,33

10. ANEXO III: MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO II

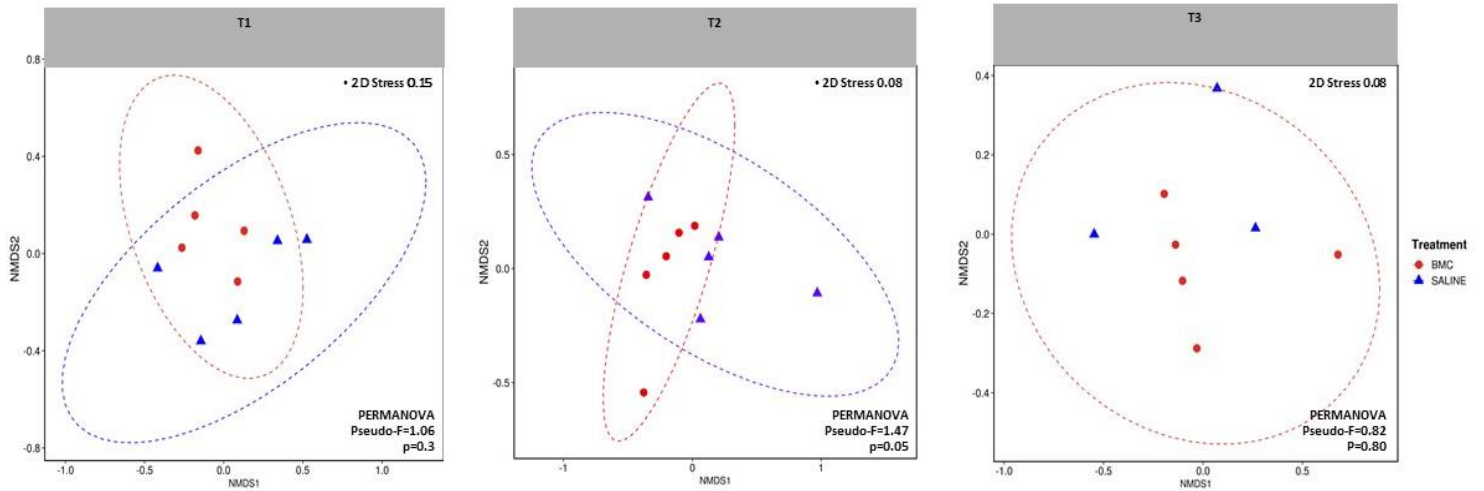
Figuras e tabelas suplementares Capítulo II da tese

Tabela suplementar 2 segue anexada em formato excel.

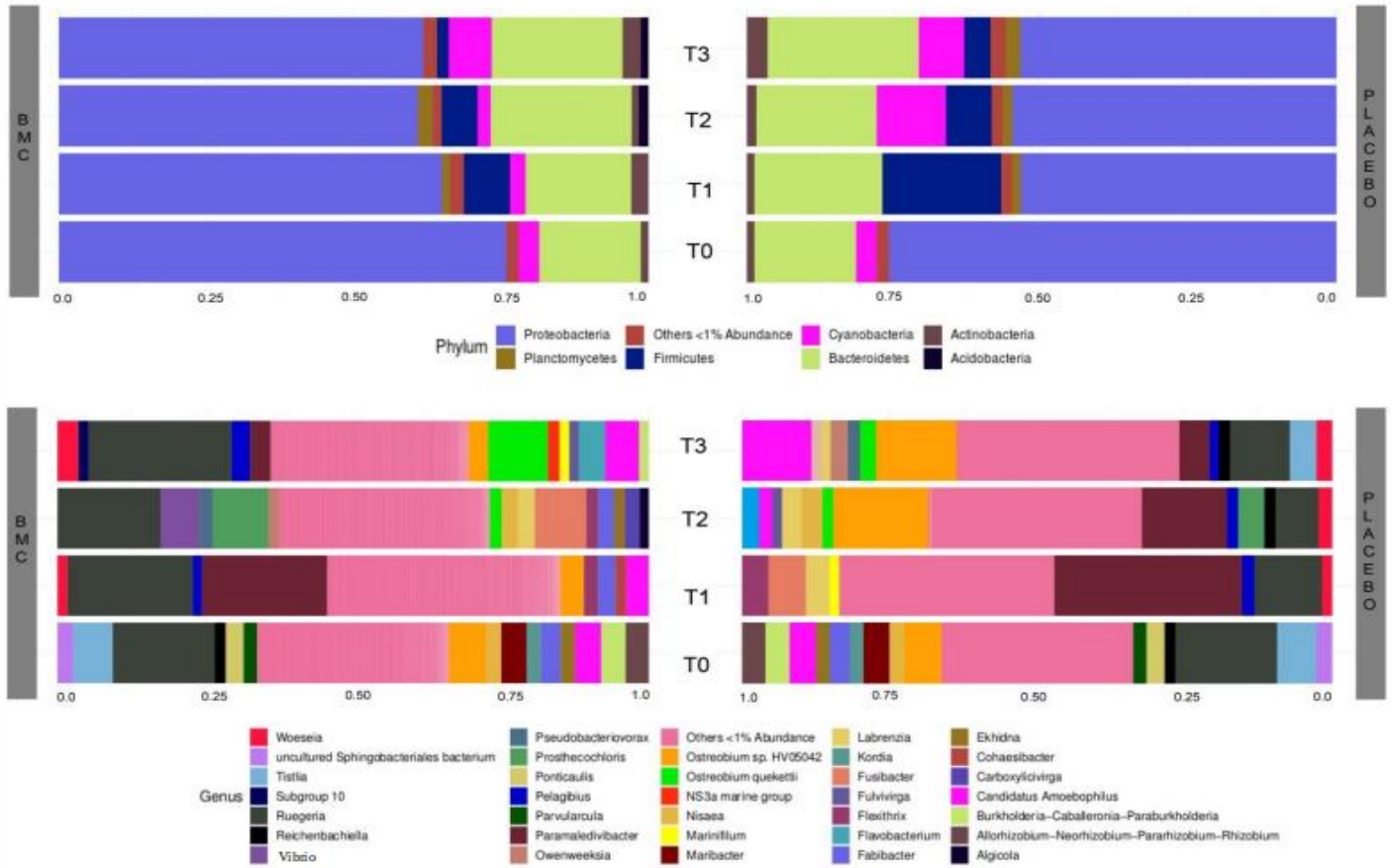
Supplementary Figure 1: Growth curve of each pBMC used to compose the consortium, plotted by optical density $\lambda = 600$ nm (A) and colony-forming units (CFU)/mL at \log_{10} scale (B).



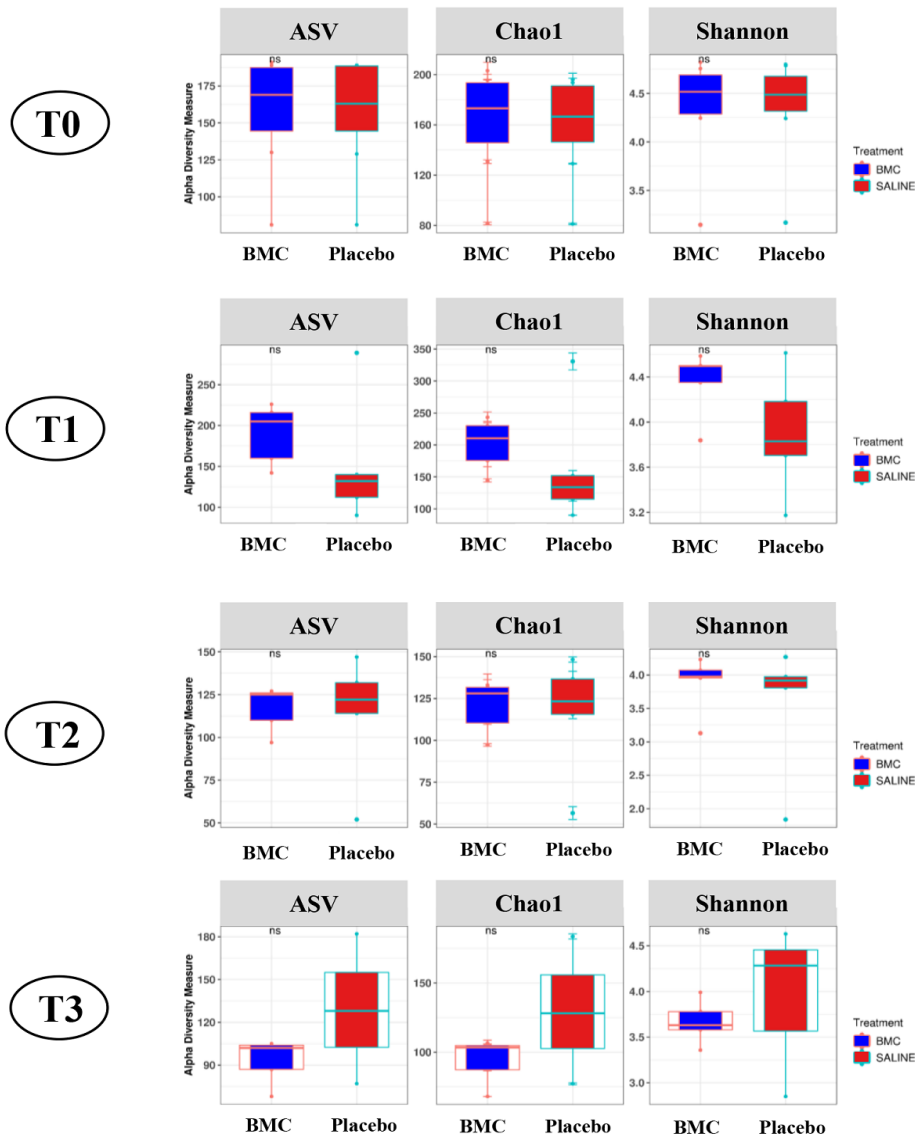
Supplementary Figure 2: NMDs by Bray-Curtis dissimilarity matrix, *Mussismilia hispida* microbiome of high temperature experiment at Time T1, T2, T3, for BMC vs placebo treatments, in high-throughput sequencing data.



Supplementary Figure 3: Relative abundance of ASVs from BMC and placebo-treated coral fragments under high-temperature regime at T0, T1, T2 and T3.



Supplementary Figure 4: Alpha diversity of coral microbial communities by ASV distribution, Chao1 and Shannon index of BMC and placebo treatments over the sampling time points.



Supplementary Table 1: Bacterial consortium selected as potential BMCs. Results obtained in the assays for the presence of catalase, Gram staining, PCR for genes of interest, antagonism activity and identification of 16S rRNA gene.

Identification	Catalase	Gram stain	<i>nifH</i> gene	<i>nirK</i> gene	<i>dmdA</i> gene	Antagonism
<i>Planococcus riftoensis</i> (CM29)	+	Positive	–	–	–	V1
<i>Brachybacterium conglomeratum</i> (M1)	+	Positive	+	–	–	–
<i>Bacillus lehensis</i> (M3)	+	Positive	+	–	+	–
<i>Bacillus oshimensis</i> (M20)	+	Positive	+	+	+	–
<i>Bacillus oshimensis</i> (M24)	+	Positive	–	–	+	–
<i>Salinivibrio</i> sp. (F2)	+	Negative	–	–	–	V1 V2

Legend: Positive or Present (+); Negative or Absent (–); V1 = *Vibrio coralliilyticus* YB (DSM19607); V2 = *Vibrio alginolyticus* (BAA450).

Supplementary Table 3: Sets of primers and their thermocycling used to screen BMCs.

Functional trait	Target gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Thermocycling
Nitrification	<i>nirK</i>	F1aCu (ATG GTC CTG CCC)	R3Cu (5'-TTG GTG TTA GAC TAG CTC CG 3')	94 °C for 2 min; 28 cycles of 94 °C for 30 s, 57 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and final extension cycle of 10 min at 72 °C
Nitrogen fixation	<i>nifH</i>	PolF (5'-TGC GAT CCG AAA GCC GAC TC-3')	PolR (5'-ATG GCC ATC ATT TCA CCG GA-3')	94 °C for 3 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min; and final extension cycle of 10 min at 72 °C
DMSP degradation	<i>dmdA</i>	D/all- spFP (5'-TAT TGG TAT AGC TAT-3')	D/all-spRP (5'-TAA ATA AAA GGT AAA TCG C-3')	94 °C for 2 min; 35 cycles of 94 °C for 20 s, 42 °C for 30 s, and 68 °C for 30 s; and final extension cycle of 5 min at 68 °C
Taxonomic identification	16S rRNA	27 F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3')	1492R (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')	94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 40s, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min; and final extension cycle of 10 min at 72 °C

Supplementary Table 4: Accession numbers in NCBI database of strains used to compose the BMC consortium.

Strain code	Accession number
CM29	MK308593
M1	MK308603
M3	MK308617
M20	MK308622
F2	MK308616

11. ANEXO IV: PRODUTIVIDADE ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

PUBLICAÇÕES

- *Publicados/aceitos*

Artigos

1. Roach, T.N.F., Shreya Y., Caruso, C., Dilworth, J., Foley, C. M., Hancock, J. R., Huckeba, J., Huffmyer, A. S., Hughes, K., Kahkejian, V. A., Madin, E. M. P., Matsuda, S. B., McWilliam, M., Miller, S., **Santoro, E.P.**, Souza, M.R., Torres-Pulliza, D., Drury, C., Madin, J. S. A Field Primer for Monitoring Benthic Ecosystems Using Structure-from-Motion Photogrammetry. *Jove-Journal of Visualized Experiments*. (accepted for publication).
2. Vilela, C.L.S., Villela, H.D.M., Duarte, G.A.S., **Santoro, E. P.**, Rachid, C.T.C.C., Peixoto, R.S. Estrogen induces shift in abundances of specific groups of the coral microbiome. *Scientific Reports*, v. 11, p. 2767-1, 2021.
3. Duarte G. A., Villela H. D. M., Deocleciano M., Messias C. S. M., Vilela C. L. S., Barno Adam, Rosado P. M., Blasquez D., Chacón M. A., **Santoro E.P.**, Cardoso P. M., Szpilman M., Sweet M., Peixoto R. S. First records of hydrocoral mass mortality in the Southwestern Atlantic: heat waves as a major threat to turbid-zone coral reef. *Front. Mar. Sci.* v. 7, p. 179, 2020.
4. Ghizelini, A. M.; Martins, K. G.; Gießelmann, U. C.; **Santoro, E. P.**; Pasqualette, L.; Mendonça-Hagler, L.C.S.; Rosado, A. S.; Macrae, A. Fungal communities in oil contaminated mangrove sediments - Who is in the mud? *Marine Pollution Bulletin*, v. 139, p. 181-188, 2019.

Capítulos de livro

5. Macrae, A.; Ghizelini, A. M.; **Santoro, E. P.**; Ribeiro, J. R. A.; Pereira, P. H. F.; Nascimento, R. P.; Oliveira, S. S. Introdução a Microbiologia Industrial: da Bioprospecção a Taxonomia. In: Nascimento, Rodrigo; Ribeiro, Bernardo; Pereira, Karen; Coelho, Maria Alice. (Org.). *Microbiologia Industrial*, Vol. 1. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2017, v. 1, p. 2-68.

Patente

6. **Santoro, E.P.**, Almeida, A.P., Ghizelini, A. M., Peixoto, R.S., Nascimento, R.P., Macrae, A. Composição fúngica, processo para sua obtenção, uso da composição fúngica, processo de descoloração e detoxificação de corantes têxteis e processo de avaliação da detoxificação de corantes têxteis. INPI, 2020. (process number: BR 10 2020 022556 1)

In review

7. **Santoro, E. P.**; Borges, R. M.; Espinoza, J.L.; Freire, M.; Messias, C. S. M. A.; Villela, H. M. D.; Mattos, L. P.; Vilela, C. L. S.; Rosado, J.G.; Cardoso, P. M.; Rosado, P. M.; Assis, J. M.; Duarte, G. A. S.; Perna, G.; Rosado, A. S.; Macrae, A.; Dupont, C. L.; Nelson, K.; Sweet, M. J.; Voolstra, C. R.; Peixoto, R. S. Coral microbiome manipulation elicits metabolic, immune and genetic restructuring to mitigate heat stress and evade mortality. *Science Advances (in review)*.
8. Silva, D.P.; Villela, H.D.M; Santos, H.F.; Duarte, G.A. S.; Ribeiro, J.R.; Ghizelini, A.M.; Vilela, Caren L.S.; Rosado, P.M.; Fazolato, C.; **Santoro, Erika P.**; Carmo, F.L.; Ximenes, D.S.; Soriano, A.U.; Rachid, C.T. C.C.; Vega Thurber, R.L.; Peixoto, R.S. Multi-domain probiotic consortium as an alternative to chemical remediation of oil spill in coral reefs in a changing world. *Microbiome (in review)*.

- *In prep*

9. **Santoro, E. P.**; Villela, H. M. D.; Duarte, G.A.; Saraiva, J.P.; Vilela, C. L. S.; Rachid, C. T. C. C.; Toscan, R.B.; Ghizelini, A.M.; Kallies, R.; Macrae, A.; Bourne, D.G.; Thomas, T.; Rocha, U.N.; Peixoto, R.S. Opening the heat box: Multi domain analysis reveals different functional and microbial association with thermal resistant and sensitive corals (*in preparation*).

10. **Santoro, E.P.***, Barno, A.*, Villela, H. D. M., Aranda, M., Voolstra, C., Thomas, T., Peixoto, R.S. Epigenetic responses to microbiome manipulation in corals (*in prep*).
* Both authors contributed the same to this work (*in preparation*).

11. **Santoro, E.P.**, Roach, T.N.F., Huckeba, J., Peixoto, R.S., Drury, C. Using probiotics for building thermal resistant reefs: Does customized medicine have a broad effect for different coral species? (*in preparation*).

PRÊMIOS E BOLSAS

1. PhD visiting student no Instituto de Biologia Marinha do Havaí (HIMB). Desenvolvimento do projeto probiotic for Hawaiian corals e colaboração em outros projetos relacionados a desova e metabólica de corais e monitoramento da comunidade bêntica através de photogrammetry. Kaneohe Bay, Hawaiian Institute of Marine Biology (HIMB), University of Hawaii (UH), USA. (Janeiro 2020 – Setembro 2020).
Supervisores: Crawford Drury and Ty Roach
2. International Young Scientists Travel Grant (ISME) para participação da 15° BAGECO Conference (2019). Aplicante.
3. Bolsa de doutorado sanduíche para University of Arizona / Biosphere 2 contemplada pelo programa CAPES-print (Dezembro 2018 – Junho 2019). Desenvolvendo e colaborando no projeto “Scaling up: solutions for reef remediation and restoration in the Biosphere 2 Ocean mesocosm” com pesquisadores de diversas universidades dos USA e do mundo, além de participar I Reef Ecology Workshop, in Biosphere 2, University of Arizona (UofA), USA.
Supervisores: Diane Thompson and Ty Roach
4. Ingresso em programa de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos -Bolsa de doutorado contemplada pela CAPES (2016-2020).

APRESENTAÇÕES

2020 – Hawaiian Institute of Marine Biology Seminars – Apresentadora.

2019 – 30° Congresso Brasileiro de Microbiologia, Maceió, AL, Brazil – apresentação de pôster.

2019 – I Reef Ecology Workshop, in Biosphere 2, Arizona, USA – Apresentação oral.

2018 - 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Germany – apresentação de pôster.

2018 - II Beneficial Microorganisms of Marine Organisms (BMMO) workshop, Leipzig, Germany – Apresentação oral.

2017 – I Beneficial Microorganisms of Marine Organisms BMMO workshop, Rio de Janeiro, Brazil – Organizadora e apresentação oral.

2017 – 29° Congresso Nacional de Microbiologia, Foz do Iguaçu, PN, Brazil – apresentação de pôster.

ORIENTAÇÕES

1. Trabalho de conclusão de curso Camila Simões Martins Messias em Ciências Biológicas (Genética), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Intitulada: Bioprospecção de microorganismos benéficos para coral de *Mussismilia hispida*. Período de orientação: 2017 – 2019
2. Co-orientação de estudante de iniciação científica Thaís Félix, Ciências Biológicas (Microbiologia)
Período de orientação: 2019.
3. Co-orientação de estudante de iniciação científica Larissa Constant, Ciências Biológicas (Biotecnologia).
Período de orientação: 2019

OUTRAS ATIVIDADES

1. Participação da Comissão Organizadora do evento científico “3º Encontro de Biotecnologia e Bioprocessos UFRJ” (2019).
2. Organização e participação das atividades do Stand de probióticos ambientais na II Feira de Inovação Biotecnológica do IMPG, UFRJ. (2019).
3. Organização e participação das atividades do Stand de probióticos ambientais na I Feira de Inovação Biotecnológica do IMPG, UFRJ. (2018).
4. Representante discente da Pós-Graduação de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) (2017/2018).
5. Colaboração no projeto CENPES/PETROBRAS – Procorais – Desenvolvimento de estratégias de biorremediação de óleo para proteção de recifes de corais. (2017).

