



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CRISTINA KAMPUS MANTOVANI

“DIVERSIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE ESPONJAS MARINHAS”

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
CRISTINA KAMPUS MANTOVANI  
Fabiana Fantinatti Garboggini  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, na área de microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M319d

Mantovani, Cristina Kampus  
Diversidade e atividade antimicrobiana de bactérias  
isoladas de esponjas marinhas / Cristina Kampus  
Mantovani. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Fabiana Fantinatti-Garboggini.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bactérias. 2. Esponja. 3. RNA ribossômico 16S.  
4. Policetídeo sintases. 5. Peptídeo sintases. 6.  
Atividade antimicrobiana. 7. Concentração inibitória  
mínima. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

**Título em inglês:** Diversity and antimicrobial activity of bacteria isolate from marine sponges.

**Palavras-chave em inglês:** Bacteria; Sponges; 16S ribosomal RNA; Polyketide synthases; Peptide synthases; Antimicrobial activity; Minimal inhibitor concentration.

**Área de concentração:** Microbiologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Fabiana Fantinatti-Garboggini, Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Ana Paula Uetanabaro.

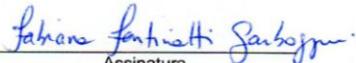
**Data da defesa:** 04/05/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 04 de maio de 2011.

BANCA EXAMINADORA

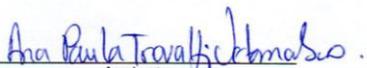
Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

  
Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro

  
Assinatura

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Aos meus queridos pais,  
Vivian e Claudio, por todo amor, carinho,  
apoio e dedicação empenhada na educação  
e formação dos seus filhos.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Fabiana Fatinatti-Garboggini agradeço, primeiramente, pela oportunidade de ter sido sua orientanda, por sua confiança em mim e pelo respeito às minhas idéias. Agradeço também pela real orientação em todas as etapas do projeto, por tantos ensinamentos e por todo crescimento proporcionado ao longo do desenvolvimento desse estudo. Agradeço pela sua paciência, auxílio e dedicação sempre e, principalmente, por sua amizade e carinho. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck Roberto pela parceria na realização deste projeto, por ter proporcionado a coleta das esponjas utilizadas para isolamento das bactérias usadas nesse trabalho e pelo auxílio na produção dos extratos brutos dos isolados. Agradeço também pela disponibilização do seu laboratório e de seus equipamentos para secagem dos extratos brutos. Agradeço também à Dra. Miriam Harumi Kossuga pelo auxílio na secagem dos extratos brutos.

À Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pela parceria na determinação da concentração inibitória mínima e pelo auxílio na discussão de problemas encontrados ao longo da produção dos extratos. Agradeço também pela disponibilização de seu laboratório para a realização de diversas etapas do trabalho.

À Dra. Vivian Furletti por nos ensinar a metodologia de determinação da concentração inibitória mínima e por nos auxiliar na realização da mesma sempre que necessário, sanando pacientemente todas nossas dúvidas e nos ajudando sempre que tivemos dificuldade.

À doutoranda Claudia Beatriz Afonso de Menezes, por pacientemente me ensinar várias das metodologias que utilizei ao longo do desenvolvimento do meu trabalho, e me auxiliar na execução de muitas delas em diversas ocasiões. Agradeço também por sua participação no isolamento das bactérias utilizadas nesse trabalho e, principalmente, pela sua amizade, carinho, conselhos e prontidão para ajudar sempre.

Ao aluno João Kleber Novais Pereira, por realizar a reativação, verificação de pureza e preservação dos isolados que utilizei no meu trabalho durante grande parte deste. Agradeço também por sua participação no isolamento das bactérias utilizadas

neste estudo e, principalmente, por sua amizade, carinho e prontidão para ajudar sempre.

À aluna Giselle Kobata Kimura, que trabalhou junto comigo na etapa de detecção da atividade antimicrobiana dos isolados, produção dos extratos brutos e detecção da concentração inibitória mínima destes, e com quem sempre pude contar durante o desenvolvimento do meu trabalho. Agradeço, também, pela amizade, companheirismo, carinho e conselhos sempre que precisei.

À Milena Binatti Ferreira, por sanar minhas dúvidas sempre que elas ocorriam, por me auxiliar com seus conselhos e dicas ao longo do desenvolvimento de minha tese, e por me auxiliar na preservação dos isolados. Agradeço também por sua participação no isolamento das bactérias utilizadas neste estudo e, principalmente, por sua amizade, carinho, companheirismo e prontidão pra ajudar sempre.

À Samantha Gonçalves da Fonseca e a Karen Simioni agradeço pelo auxílio no desenvolvimento do projeto sanando dúvidas e me auxiliando no desenvolvimento deste sempre que necessário.

À Rebeca Rocha Leal agradeço pela participação no isolamento das bactérias utilizadas neste estudo.

Aos meus colegas e amigos da divisão de Recursos Microbianos de CPQBA/UNICAMP, agradeço pela amizade, auxílio, apoio e carinho nos momentos difíceis que enfrentei durante o desenvolvimento deste trabalho. Com certeza sua amizade tornou nossa convivência muito mais prazerosa durante a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo suporte financeiro do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os meus amigos da Unicamp e de São Paulo por todo carinho, amizade, força, incentivo e presença constante, pois todos vocês colaboraram na formação da pessoa que sou hoje.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço aos meus pais, por todo apoio e carinho durante toda minha formação, por terem permitido que eu viesse estudar na Unicamp e continuado os meus estudos no Mestrado. Por sempre terem me incentivado a lutar pelos meus sonhos, a ter metas e a persegui-las com dedicação e afinco. E, principalmente, por estarem sempre do meu lado quando precisei deles e por me amarem muito! Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

Agradeço à minha irmã querida que, mesmo longe, não deixou de ser minha amiga e de me apoiar quando precisei dela. Divergências existiram, mas elas são pequenas perto do amor que sentimos uma pela outra. Com ela também pude contar sempre, e queria agradecer por sua presença em minha vida e por sua amizade. Amo muito!

Agradeço aos meus avós queridos, que são um grande exemplo de vida e de luta, e que sempre me inspiraram muito na busca pelos meus objetivos. Agradeço pelo seu amor e carinho sempre, pelo companheirismo e amizade também!

Agradeço à minha tia, por se preocupar tanto comigo sempre! Obrigada pelo seu carinho, amor e amizade.

Agradeço aos demais familiares por todo carinho, amor, amizade e presença em minha vida. Sem vocês, eu não seria o que sou hoje. Muito obrigada!!

Ao meu Mestre supremo, por iluminar meus caminhos!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. AS ESPONJAS .....	4
2.2. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS .....	6
2.3. COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS ESPONJAS MARINHAS .....	8
2.4. POLICETÍDEO SINTASE E PEPTÍDEO SINTASE NÃO RIBOSSOMAL .....	11
3. OBJETIVOS .....	16
3.1. OBJETIVO GERAL .....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. MANUTENÇÃO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS .....	17
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS .....	18
4.2.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	18
4.2.2. AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	19
4.2.3. ARDRA (Amplified Ribossomal Restriction Analysis) .....	20
4.2.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S .....	21
4.3. AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PKS I, PKS II E NRPS .....	22
4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	23
4.4.1. MÉTODO DA DIFUSÃO EM BLOCO DE ÁGAR .....	23
4.4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO BRUTO DAS BACTÉRIAS .....	24
4.4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) .....	26
4.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA/FUNGICIDA MÍNIMA (CBM/CFM) .....	28
5. RESULTADOS .....	29

5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS.....	29
5.2.	AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PKS I, PKS II E NRPS .....	34
5.3.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
5.3.1.	MÉTODO DA DIFUSÃO EM BLOCO DE ÁGAR.....	38
5.3.2.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	41
5.3.3.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	41
6.	DISCUSSÃO .....	44
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS.....	44
6.2.	AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS À ESPONJAS.....	51
7.	CONCLUSÕES .....	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
	APÊNDICE 1. Identificação, avaliação genética do potencial biotecnológico e atividade antimicrobiana das bactérias isoladas de esponjas marinhas. ....	77
	ANEXO 1. Condições de isolamento das bactérias associadas à esponjas. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> <i>Primers</i> selecionados para amplificação de fragmentos dos genes dos sistemas <i>PKS I</i> , <i>PKS II</i> e <i>NRPS</i> de bactérias isoladas de esponjas marinhas.....	22
<b>Tabela 2.</b> Escala de classificação de halos de inibição segundo Matsuura (2004).....	24
<b>Tabela 3.</b> Caracterização molecular e avaliação do potencial biotecnológico por meio da amplificação dos fragmentos dos genes <i>PKS-I</i> , <i>PKS-II</i> e <i>NRPS</i> de bactérias cultiváveis recuperadas de esponjas marinhas .....	35
<b>Tabela 4.</b> Média e classificação do tamanho halo de inibição das bactérias isoladas de esponjas frente à bactéria indicadora <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 825 (Indicadora 1) e <i>B. subtilis</i> CBMAI 707 (Indicadora 2).....	39
<b>Tabela 5.</b> Bactérias isoladas de esponjas marinhas que demonstraram atividade antimicrobiana pela determinação da CIM contra os micro-organismos <i>B. subtilis</i> ATCC 6051 e <i>E. coli</i> ATCC 11775, e seus resultados de amplificação para os fragmentos dos genes <i>PKS-I</i> , <i>PKS-II</i> e <i>NRPS</i> .....	43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura básica de uma poliketide sintase. Fonte: Salomon e colaboradores (2004) .....13
- Figura 2.** Estrutura básica de um peptídeo sintase não ribossomal (C: condensação, A: adenilação, PCP: proteína transportadora peptidil, E: epimerase, Cy: ciclização, Ox: oxidorreductase). Imagem adaptada de Salomon e colaboradores (2004).....14
- Figura 3.** Árvore filogenética baseada em análises da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* isoladas de esponjas. Distâncias evolutivas foram baseadas em modelo de Kimura 2p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 re-amostragens. *Haloferax lucentense*<sup>T</sup> (AB081732) foi utilizada como *outgroup*.....31
- Figura 4.** Árvore filogenética baseada em análises da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* isoladas de esponjas. Distâncias evolutivas foram baseadas em modelo de Kimura 2p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 re-amostragens. *Haloferax lucentense*<sup>T</sup> (AB081732) foi utilizada como *outgroup*.....32
- Figura 5.** Diversidade de bactérias recuperadas das esponjas *Drasmodon reticulata* (A.) (14 isolados), *Chelonaplysilla erecta* (B.) (33 isolados), *Petromica citrina* (C.) (31 isolados) e *Axinella corrugata* (D.) (8 isolados).....33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>°C</b>	graus Celsius
<b>μL</b>	microlitros
<b>16S</b>	RNA ribossomal
<b>A</b>	adenilação
<b>AC</b>	<i>Axinella corrugata</i>
<b>ACP</b>	proteína transportadora de acil
<b>AMH</b>	Agar Müeller-Hinton
<b>ARDRA</b>	<i>Amplified Ribossomal Restriction Analysis</i>
<b>AT</b>	aciltransferase
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
<b>C</b>	condensação
<b>CBM</b>	concentração bactericida mínima
<b>CBMAI</b>	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
<b>CE</b>	<i>Chelonaplysilla erecta</i>
<b>CFM</b>	concentração fungicida mínima
<b>CIM</b>	concentração inibitória mínima
<b>cm</b>	centímetro
<b>DICE</b>	coeficiente de DICE (coeficiente de associação estatístico)
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleotideo trifosfato

<b>DR</b>	<i>Dracopis reticulata</i>
<b>DRM</b>	Divisão de Recursos Microbianos
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetracético
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>h</b>	hora
<b>kDa</b>	quilodalton
<b>KS</b>	cetosintase
<b>M</b>	molar
<b>MEGA</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>ng</b>	nanograma
<b>nm</b>	nanômetro
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NRPS</b>	<i>Non Ribosomal Peptide Synthetases</i> (Pepídeo sintases não ribossomais)
<b>OTUs</b>	<i>Operational Taxonomic Units</i> (Unidades taxonômicas operacionais)
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PC</b>	<i>Petromica citrina</i>
<b>PCP</b>	proteína transportadora de peptídil

<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PKS</b>	<i>Polyketide Synthases</i> (Policetídeo sintases)
<b>RDP</b>	<i>Ribosomal Database Project</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RNAr</b>	ácido ribonucleico ribossomal
<b>RNAse</b>	ribonuclease
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDA</b>	Sabouraud Destrose Ágar
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SET</b>	Tris-Salt-EDTA
<b>T</b>	linhagem tipo
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>TSA</b>	Tryptone Soya Broth
<b>TTC</b>	cloreto de trifetil tetrazolium
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colônia
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<b>V</b>	volts
<b>vol</b>	Volume

## RESUMO

Nas últimas décadas um grande número de compostos de interesse biotecnológico, como por exemplo, citotoxinas, agentes antifúngicos, antimicrobianos, antivirais e anticancerígenos têm sido isolados de esponjas marinhas. Entretanto, estudos comprovam que, em muitos casos, os compostos ativos desses animais são oriundos de micro-organismos associados, que podem compor até 60% do volume tecidual das esponjas. A presente proposta teve por objetivo a caracterização taxonômica da diversidade de bactérias cultiváveis associadas às esponjas coletadas no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, e a avaliação da atividade antimicrobiana a partir de extratos orgânicos brutos dessas bactérias. Um total de 86 bactérias foi recuperado das esponjas *Axinella corrugata*, *Dragmacidon reticulata*, *Chelonaplysilla erecta* e *Petromica citrina* utilizando diferentes meios de cultivo. A diversidade das bactérias foi caracterizada utilizando dados de morfologia, ARDRA (*Amplified Ribosomal Restriction Analysis*) e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S, cuja análise permitiu a identificação de membros pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* num total de 15 gêneros distintos. O gênero *Pseudovibrio* foi o único presente em todas as esponjas amostradas, e os gêneros *Bacillus*, *Ruegeria*, *Vibrio*, *Staphylococcus* e *Erythrobacter* estavam presentes em mais de uma esponja. A esponja *Dragmacidon reticulata* apresentou a maior diversidade bacteriana, englobando oito diferentes gêneros, dentre eles, um representante do gênero *Cyclobacterium*, o qual até onde se sabe, foi isolado pela primeira vez de uma esponja marinha. O gênero *Bacillus* esteve presente em três esponjas, mas na *Petromica citrina*, endêmica do Brasil, o gênero ficou representado em 74% dos isolados obtidos. Este estudo foi o primeiro relato sobre a diversidade de bactérias cultiváveis da esponja *Petromica citrina*. Todos os isolados foram avaliados quanto à presença ou ausência dos fragmentos dos genes *PKS* (*Polyketide Synthases*) e *NRPS* (*Non Ribosomal Peptide Synthetases*), visando à investigação do potencial biotecnológico das bactérias, e mais da metade delas apresentaram pelo menos um dos genes estudados. Uma triagem da atividade antimicrobiana utilizando o método da difusão em bloco de ágar demonstrou que 21 isolados foram promissores para produção de antimicrobianos. Destes isolados foram obtidos os extratos orgânicos brutos, os quais foram testados quanto à determinação da concentração inibitória mínima contra oito micro-organismos indicadores. Um total de 13 extratos orgânicos brutos, em sua maioria representantes do gênero *Bacillus*, demonstraram ação contra o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6051 e um deles demonstrou ação contra o micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 11775. A numerosa inibição de estirpes de *Bacillus* por outros *Bacillus* sugere que a atividade possa ser gerada por bacteriocinas, polipeptídeos produzidos pela via ribossomal que atuam na inibição de crescimento de grupos próximos de micro-organismos. Sua possível função no meio ambiente é prover vantagem seletiva através da eliminação de um competidor relativamente próximo. Ainda, um representante do gênero *Exiguobacterium* apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, resultado este não descrito até o presente na literatura.

**Palavras-chaves:** Bactérias, esponjas, RNA ribossômico 16S, policetídeo sintases, peptídeo sintases, atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima.

## ABSTRACT

In recent decades a large number of compounds of biotechnological interest, such as cytotoxins, antifungal, antimicrobial, antiviral and anticancer substances have been isolated from marine sponges, however, studies show that, in many cases, the active compounds are actually produced by associated microorganisms, which can comprise up to 60% of the volume of sponge tissue. This proposal aimed to characterize the taxonomic diversity of culturable bacteria associated with sponges collected in the northern coast of São Paulo, Brazil, and to evaluate the antimicrobial activity from crude organic extracts of these bacteria. A total of 86 bacteria were recovered from sponges the *Axinella corrugata*, *Dracmacidon reticulata*, *Petromica citrina* and *Chelonaplysilla erecta* using different culture media. The diversity of bacteria was characterized using data from morphology, ARDRA (*Amplified Ribosomal Restriction Analysis*) and sequencing of 16S ribosomal RNA gene, whose analysis allowed the identification of members belonging to the phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, in a total of 15 distinct genera. The genus *Pseudovibrio* was the only one present in all sponges sampled, and the genera *Bacillus*, *Ruegeria*, *Vibrio*, *Staphylococcus* and *Erythrobacter* were present in more than one sponge sampled. The sponge *Dracmacidon reticulata* showed the highest bacterial diversity, encompassing eight different genera, among which the genus *Cyclobacterium*, which, as far as is known, was first isolated from a marine sponge. The genus *Bacillus* was present in three sponges, but in *Petromica citrina*, endemic to Brazil, the genus accounted for 74% of the isolates. This study was the first report on the diversity of culturable bacteria from the sponge *Petromica citrina*. All isolates were evaluated for the presence or absence of NRPS (non ribosomal peptide synthetases) and PKS (polyketide synthase) genes in order to investigate the biotechnological potential of bacteria, and over half of the isolates had at least one of these genes. A screening of antimicrobial activity using the diffusion agar disk method showed that 21 isolates were promising for the production of antibiotics. Crude organic extracts from these isolates were produced and tested against eight indicator microorganisms to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). A total of 13 crude organic extracts, most of the genus *Bacillus*, showed inhibitory activity against the microorganism *Bacillus subtilis* ATCC 6051, and one of them showed activity against the microorganism *Escherichia coli* ATCC 11775. The large inhibition of *Bacillus* strains to other *Bacillus* strains suggests that the activity can be generated by bacteriocins produced through ribosomal polypeptides that inhibit close groups of microorganisms. Its possible role in the environment is to provide a selective advantage by eliminating a relatively close competitor. Still, a representative of the genus *Exiguobacterium* showed antimicrobial activity against *B. subtilis*, which was not described in the literature up to date.

**Keywords:** Bacteria, sponges, 16S ribosomal RNA, polyketide synthases, peptide synthases, antimicrobial activity, minimal inhibitor concentration.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são a maior causa de morte nos países tropicais, contabilizando aproximadamente metade de todas as mortes. Além disso, no período entre 1940 e 2004 foi relatado o aparecimento de 335 doenças infecciosas na população humana global (Jones *et al.*, 2008). Somado a isso, a crescente resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos existentes tornou-se um problema de saúde pública mundial e, na tentativa de superá-lo, as pesquisas com foco na descoberta de novos e eficientes compostos antibacterianos têm crescido nas últimas décadas (Devasahayam *et al.*, 2010). A atenção dos cientistas é voltada, principalmente, na exploração de novos ambientes ou habitats visando à obtenção de compostos ainda desconhecidos (Lo Giudice *et al.*, 2007; Santos *et al.* 2010).

Embora a diversidade biológica no ambiente terrestre seja considerada extraordinária, acredita-se que os oceanos representam o *habitat* cuja diversidade é considerada a maior do planeta. Em alguns ecossistemas marinhos, como o mar profundo e recifes de corais, estima-se que a diversidade biológica seja maior que nas florestas tropicais (Haefner, 2003). Assim, a exploração deste ambiente torna-se necessária e extremamente promissora no que diz respeito à descoberta de novos compostos com potencial biotecnológico.

Estudos na literatura demonstram que os invertebrados marinhos pertencentes às classes *Porifera*, *Mollusca*, *Cnidaria*, *Anthozoa*, *Echinodermata*, e *Bryozoa* se são uma fonte rica de vários metabólitos bioativos (Bérdy, 2005; Sipkema *et al.*, 2005). No entanto, evidências sugerem que em muitos dos casos os compostos ativos isolados desses animais são oriundos de micro-organismos simbióticos (Imhoff & Stohr 2003, Bérdy, 2005). Como exemplo, podemos citar a esponja *Mycale adhaerens*, da qual foi isolado o composto exofilina A, um ácido dihidroxidecanoico ativo contra bactérias

Gram- positivas. Tal composto é produzido não pela esponja em si, mas pelo micro-organismo *Exophiala pisciphila* a ela associada (Doshida *et al.*, 1996).

Um grande número de compostos de interesse biotecnológico, como por exemplo, citotoxinas, antifúngicos, antibióticos, antivirais, e, principalmente, anticancerígenos foram isolados de esponjas marinhas e micro-organismos associados (Sipkema *et al.*, 2005). Além disso, um número maior de compostos derivados de esponjas estão em testes clínicos e pré-clínicos quando comparados a compostos associados a outros filos marinhos (Osinga *et al.*, 2001, Blunt *et al.*, 2005).

Recentemente, tem-se tornado alvo de atenção os policetídeos e os peptídeos não ribossomais, substâncias produzidas por enzimas multifuncionais de alto peso molecular que apresentam atividades biológicas variadas, as quais são denominadas, respectivamente, policetídeo sintases (*PKS*, do inglês *polyketide synthases*) e peptídeo sintases não ribossomais (*NRPS*, do inglês *non-ribosomal peptide synthetase*) (Salomon *et al.*, 2004). Os antibióticos vancomicina e penicilina, o agente imunossupressor ciclosporina e o composto antitumoral bleomicina são alguns exemplos do vasto grupo de peptídeos não ribossomais com atividades bioativas (Salomon *et al.*, 2004).

Apesar da grande ocorrência de esponjas nos ecossistemas marinhos, a investigação das comunidades bacterianas associadas a elas tem sido restrita a poucas áreas (Althoff *et al.*, 1998, Fieseler *et al.*, 2004, Webster *et al.*, 2004, Steindler *et al.*, 2005, Taylor *et al.*, 2005, Enticknap *et al.*, 2006, Kim & Fuerst, 2006, Fieseler *et al.*, 2007).

Segundo Hardoim e colaboradores (2009) faltam estudos de micro-organismos associados a esponjas do Sul do oceano Atlântico. O Brasil possui 8.000 km de costa com largas áreas de recifes de corais que abrigam uma alta diversidade de esponjas marinhas (Muricy & Hajdu, 2006, Santos *et al.* 2010). Embora esteja claro que as

esponjas possuem abundantes consórcios microbianos, poucos estudos investigam a composição de comunidades de bactérias associadas às esponjas brasileiras (Turque *et al.*, 2008, Hardoim *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). Pouca atenção é dada, inclusive, ao cultivo de bactérias associadas às esponjas e suas atividades biológicas (Santos *et al.*, 2010).

Neste contexto, este trabalho visa acessar a diversidade e composição da comunidade bacteriana de quatro espécies de esponjas coletadas no litoral norte do estado de São Paulo, avaliar o potencial biotecnológico dos isolados por meio da caracterização da presença ou ausência dos fragmentos dos genes *PKS* e *NRPS*, bem como avaliar sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. AS ESPONJAS

Os poríferos, também conhecidos como esponjas, são organismos invertebrados pluricelulares, bentônicos e sésseis, habitantes de oceanos tropicais, temperados e polares, com algumas espécies encontradas em água doce (Hentschel *et al.*, 2002; Radjasa *et al.*, 2007a, Taylor *et al.*, 2007). São, ainda, organismos filtradores, apresentando um sistema de canais exclusivo do filo *Porifera*, ao redor do qual seu corpo é construído, e por onde circulam grandes quantidades de água. Os coanócitos, células flageladas especializadas, podem filtrar as partículas de alimento (incluindo bactérias e microalgas) da água, e estas são transferidas para o mesófilo, uma extensa camada de tecido conjuntivo (Taylor *et al.*, 2007). No mesófilo, as partículas de alimento são digeridas via fagocitose por outro grupo de células, fornecendo os nutrientes necessários para o desenvolvimento da esponja (Taylor *et al.*, 2007). Também no mesófilo das esponjas podem se localizar densas comunidades de micro-organismos (Taylor *et al.*, 2007).

Taxonomicamente existem três classes de esponjas: a Classe *Calcarea* (cinco ordens e 24 famílias), a Classe *Demospongiae* (15 ordens e 92 famílias) e a Classe *Hexactinellida* (seis ordens e 20 famílias). Cerca de 15.000 espécies de esponjas já foram descritas, sendo na sua maioria representantes da classe *Demospongiae*, e acredita-se que sua verdadeira diversidade pode ser ainda maior (Fieseler *et al.*, 2004).

O Brasil tem uma costa imensa, com uma fauna que é, em geral, pouco estudada, e o filo *Porifera* é um dos menos estudados (Cedro *et al.*, 2007). Há poucos estudos sobre diversidade de esponjas na costa brasileira (Cedro *et al.*, 2007, Muricy & Moraes, 1998, Muricy & Silva, 1999) bem como conhecimento de sua distribuição, reprodução e tipos de interações ecológicas (Cedro *et al.*, 2007).

Um estudo feito no Estado de Pernambuco detectou uma enorme diversidade de esponjas, representadas por 14 ordens, incluindo uma da classe *Calcarea* e 13 ordens da classe *Desmospongie*, englobando 28 famílias (Muricy & Moraes, 1998).

A esponja *Amphimedon viridis* é extremamente abundante na costa brasileira (Muricy *et al.*, 1991, Hajdu *et al.*, 1999). Outras esponjas, como *Cinachyrella alloclada*, *Chondrilla* aff. *nucula*, *Cliona* aff. *celata*, *C. varians*, *H. melana*, *Tedania ignis* e *Tethya*, também são comuns em determinadas regiões da costa brasileira (Muricy *et al.*, 1991, Klautau *et al.* 1999, Muricy & Ribeiro, 1999, Lazoski *et al.*, 2001).

As espécies mais frequentes nas estações amostradas em estudo feito no Rio de Janeiro foram *Spirastrella hartmani*, *Cinachyrella alloclada*, *Chondrilla* aff. *nucula* e *Scopalina ruetzleri* (Moraes *et al.*, 2003).

Outro estudo realizado no litoral do estado de Alagoas por Cedro e colaboradores (2007), recuperou espécies das esponjas *Cinachyrella apion*, *lotrochota birotulata* e *Spirastrella coccínea*, mais raras na costa brasileira. Também foram encontrados exemplares da esponja *Dragmacidon reticulata*, a qual foi uma das espécies estudadas neste trabalho.

A esponja *Dragmacidon reticulata* possui cor vermelha viva, alaranjada ou amarronzada. Extratos brutos desta espécie apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e citotóxica. Ela ocorre nos Estados Unidos, Golfo do México, Caribe e ao longo da costa brasileira, sendo comum no litoral sudeste (Muricy & Hajdu, 2006; Muricy *et al.*, 2008).

Outra esponja estudada pertence a espécie *Axinella corrugata*, a qual possui uma cor laranja viva a vermelha e formato arbustivo, podendo ser lobada ou ramificada, com uma base estreita e às vezes com pedúnculo. Coloniza substrato rochoso em águas rasas, às vezes na zona de transição entre rocha e areia, de 2 a 15 m de

profundidade. No Brasil ela ocorre em alguns locais da costa brasileira, e está presente também no Caribe e nos Estados Unidos (Muricy & Hajdu, 2006).

A esponja *Petromica citrina* apresenta cor amarela a laranja-amarelada, com forma incrustante a maciça, irregular, com uma base relativamente grossa. É encontrada em costões rochosos rasos e, até o presente, é considerada uma espécie endêmica do Sul e Sudeste do Brasil (Muricy *et al.*, 2001; Muricy & Hajdu, 2006). Esta foi a terceira espécie de esponja estudada neste trabalho.

Finalmente, a última espécie estudada foi a esponja *Chelonaplysilla erecta*, a qual possui na superfície uma cor roxa ou violeta escura com reflexos esbranquiçados e forma maciça, lobada. Facilmente identificável pela reticulação de detritos na superfície. Comum em costões rochosos, exposta à luz, 1 a 20 m de profundidade. Ocorre no Caribe, Mediterrâneo, Mar Vermelho e na costa brasileira (Muricy & Hajdu, 2006).

## **2.2. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS**

As esponjas abrigam uma grande comunidade de micro-organismos, que compõem uma porcentagem significativa (até 50-60%) de sua biomassa (Bergmann & Burke, 1955; Wang, 2006) e com a qual o invertebrado pode estabelecer diferentes relações, desde parasitárias até simbióticas (Dharmaraj *et al.*, 2010). As funções simbióticas atribuídas a microbiota associada às esponjas incluem a aquisição de nutrientes, estabilização do esqueleto da esponja, tratamento de resíduos metabólicos e produção de metabólitos secundários (Hentschel *et al.*, 2002).

Existem dois caminhos através dos quais uma esponja adquire os micro-organismos durante seu desenvolvimento. A primeira é pela absorção seletiva de determinadas bactérias presente na coluna de água circundante que passa pela esponja durante a alimentação por filtração. A segunda é a transmissão vertical dos

micro-organismos através dos gametas da esponja, com a inclusão das bactérias nos oócitos ou nas larvas (Radjasa *et al.*, 2007b). No geral, a associação entre esponjas e micro-organismos depende da capacidade destes em resistir ao processo digestivo e a resposta imune das esponjas para habitá-las (Wilkinson, 1987).

Uma esponja hospedeira pode possuir diversos simbiontes. A esponja *Theonella swinhoei*, por exemplo, abriga bactérias heterotróficas unicelulares, cianobactérias unicelulares e bactérias filamentosas heterotróficas simultaneamente (Bewley *et al.*, 1996). Por outro lado, existem evidências de que alguns micro-organismos simbióticos podem habitar esponjas específicas (Taylor *et al.*, 2007).

A comunidade microbiana simbiótica é extremamente diversa e a composição das espécies demonstra uma variação temporal e geográfica (Webster & Hill, 2001). Ela inclui um diverso ramo de arqueas, bactérias heterotróficas, cianobactérias, algas verdes, algas vermelhas, cryptofitas, dinoflagelados e diatomáceas (Santavy *et al.*, 1990, Larkum, 1987; Preston *et al.*, 1996).

Um estudo utilizando a estratégia independente de cultivo, através da produção de bibliotecas do gene do RNA ribossomal 16S e DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), revelou a presença de representantes dos filos: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, e *Verrucomicrobia* (Hentschel *et al.*, 2006).

Além disso, membros de diversos filos bacterianos, como os *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foram isolados em cultura pura a partir de esponjas marinhas (Olson *et al.*, 2000; Burja & Hill, 2001; Hentschel *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001; Olson *et al.*, 2002; Pimentel-Elardo *et al.*, 2003; Chelossi *et al.*, 2004; Dieckmann *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Lafi *et al.*, 2005; Montalvo *et al.*, 2005; Sfanos

*et al.*, 2005; Enticknap *et al.*, 2006; Kim & Fuerst, 2006; Lee *et al.*, 2006; Scheuermayer *et al.*, 2006).

Com algumas exceções em *Euryarchaeota* (Webster *et al.* 2001; Holmes & Blanch, 2006) arqueas reportadas em esponjas marinhas são membros do filo *Crenarchaeota* (Preston *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 2001; Margot *et al.* 2002; Lee *et al.*, 2003; Webster *et al.*, 2004; Holmes & Blanch, 2006). Biomarcadores lipídicos também sugerem a presença de membros de ambos os filios *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* em uma esponja ártica de águas profundas (Pape *et al.*, 2006).

Dentre os micro-organismos eucarióticos, foram reportados dinoflagelados (Garson *et al.*, 1998; Hill & Wilcox, 1998, Scalera-Liaci *et al.* 1999), e diatomáceas (Bavestrello *et al.*, 2000; Cerrano *et al.*, 2000; Cerrano *et al.*, 2004) em esponjas, com destaque para as diatomáceas prevalentes em ambientes polares.

### **2.3. COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS ESPONJAS MARINHAS**

As esponjas são organismos sésseis simples que, durante sua evolução, desenvolveram mecanismos químicos defensivos potentes para se protegerem de predadores e competidores, assim como de micro-organismos infecciosos. Estudos mostram que os metabólitos secundários em esponjas desempenham um papel crucial na sua sobrevivência no ecossistema marinho (Thakur *et al.*, 2004). Há um interesse biomédico e um potencial para uso na indústria farmacêutica desses produtos (Jensen & Fenical, 1994; Bernan *et al.* 1997; Haygood *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Osinga *et al.*, 2001; Proksch *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2007), uma vez que estes apresentam atividades antivirais, antitumorais, antimicrobianas e propriedades citotóxicas gerais (Wang, 2006).

Curiosamente, de 13 produtos naturais marinhos que estão em ensaios clínicos de novos fármacos, 12 são provenientes de invertebrados (Proksch *et al.*, 2003, Thakur *et al.*, 2005, Gunasekera *et al.*, 2004 ). Entre eles, o filo *Porifera* é o que proporciona um maior número de produtos naturais, especialmente os compostos farmacologicamente ativos (Thakur *et al.*, 2005, Gunasekera *et al.*, 2004). No entanto, evidências demonstram que certos compostos advindos de esponjas marinhas são sintetizados, na verdade, pelos micro-organismos simbiotes (Shigemori *et al.*, 1992; Kobayashi & Ishibashi, 1993; Unson *et al.*, 1994; Piel *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Hardoim *et al.*, 2009, Li, 2009, Zhang *et al.* , 2009a e 2009b), embora outros sejam genuinamente sintetizados pelas próprias esponjas (Otero-González, 2010), ou tem sua origem sob investigação (Zheng *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001).

A primeira evidência experimental a apoiar a hipótese de que os micro-organismos marinhos simbióticos das esponjas seriam os reais produtores de certos compostos bioativos foi derivada do trabalho de Faulkner e colaboradores (2000), que investigou a localização de produtos naturais na associação de micro-organismos e esponjas. Neste estudo, as populações de células no interior das amostras de esponjas foram separadas por centrifugação diferencial e as frações obtidas foram analisadas quimicamente. Dessa forma, foi possível localizar dois compostos com diferentes bioatividades em duas cepas bacterianas distintas. Ambas as cepas bacterianas foram isoladas da esponja *Theonella swinhoei*.

A enorme diversidade de metabólitos secundários ativos que podem ser produzidos pelos micro-organismos simbióticos envolve polipeptídios complexos, peptídeos não ribossomais, terpenóides, alcalóides; todos com propriedades igualmente relevantes (Friedrich *et al.*, 1999; Matsunaga & Fusetani, 2003; Fusetani, 2004; Piel, 2004; Blunt *et al.*, 2005; Keyzers & Davies-Coleman, 2005; Sipkema *et al.*, 2005; Moore, 2006; Piel, 2006; Taylor *et al.*, 2007, Hardoim *et al.*, 2009).

O grande número de cepas bacterianas isoladas de esponjas com atividades antimicrobianas sugere que as esponjas marinhas representam um nicho ecológico que abriga uma grande diversidade microbiana não caracterizada e, ainda, um inexplorado potencial para a busca de novos metabólitos secundários (Marinho *et al.*, 2009).

Em uma bactéria associada à esponja marinha *Dysidea avara*, coletada no Mar Adriático, foi detectada a produção do composto 2-metil-1, 4 - naftoquinona. Este composto mostrou fortes propriedades antiangiogênicas e antimicrobianas (Thakur e Müller, 2005). Outra bactéria, *Alcaligenes faecalis* A72, produzindo o composto L, L-dicetopiperazina com moderada ação antimicrobiana, foi encontrada em associação com a esponja *Stelletta tenuis*, no Mar da China Meridional (Li, 2009).

Marinho e colaboradores (2009) isolaram uma nova linhagem de *Pseudomonas putida* (designada Mm3 *P. putida*) a partir da esponja *Mycale microsigmatosa* no Rio de Janeiro, produtora de uma potente substância antimicrobiana ativa contra bactérias multirresistentes (Marinho *et al.*, 2009).

Um estudo recente de Santos e colaboradores (2010) encontrou doze isolados bacterianos de esponjas marinhas brasileiras com atividade antimicrobiana contra, pelo menos, uma das linhagens indicadoras utilizadas em seu estudo. Zhang e colaboradores (2009) encontraram 15 isolados bacterianos de esponjas marinhas no Sul da China com atividade antimicrobiana, dentre os quais a bactéria *Alcaligenes* sp. A11 se mostrou ativa contra quatro dos seis micro-organismos indicadores utilizados no estudo. Os diferentes espectros antimicrobianos indicam o potencial de diversidade química dos metabólitos biologicamente ativos dessas bactérias (Zhang *et al.*, 2009).

Esses estudos, dentre outros, mostram que o estudo da atividade antimicrobiana de extratos de micro-organismos isolados de esponjas marinhas pode ser muito promissor. No entanto, um fator extremamente importante a ser considerado é que o

micro-organismo deve produzir o composto de interesse em condições de laboratório, uma vez fora do seu habitat natural, as bactérias podem frequentemente alterar seu metabolismo devido às alterações nas condições de crescimento ou a falta de pressão seletiva (Hentschel *et al.*, 2001).

Como a síntese de compostos químicos pode ser complicada e onerosa devido à complexidade estrutural, a produção de pelo menos alguns compostos por micro-organismos pode levar a uma produção sustentável e ilimitada de compostos através de cultivo de micro-organismos relevantes (Proksch *et al.*, 2002; Piel, 2004).

#### **2.4. POLICETÍDEO SINTASE E PEPTÍDEO SINTASE NÃO RIBOSSOMAL**

Os policetídeos e os peptídeos não ribossomais são importantes classes de compostos marinhos naturais, compreendendo uma grande e estruturalmente distinta família de produtos naturais bioativos (Hill, 2003, Hill, 2004, Hill, 2005), os quais incluem diversos antibióticos, toxinas, sideróforos e imunossupressores (Cane *et al.*, 1998; Crosa & Walsh, 2002). Estes compostos são sintetizados por enzimas multifuncionais de alto peso molecular (200-2,000 kDa) de bactérias, fungos e plantas (Cane *et al.*, 1998; Moffitt & Neilan, 2003), denominadas peptídeo sintase não ribossomal (*NRPS*) e policetídeo sintase (*PKS*).

Muitos policetídeos vêm sendo isolados de esponjas (Okada *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004), mas a investigação dos genes que codificam as *PKS* de micro-organismos marinhos é ainda incipiente (Zhang *et al.*, 2009).

Enquanto os produtos dessas vias são muito diferentes em estrutura e função, eles têm em comum um sistema colinear de montagem que utiliza um cofator para permitir que uma variedade de atividades enzimáticas ocorra de uma forma altamente ordenada (Salomon *et al.*, 2004).

Estas enzimas são organizadas de forma modular, e utilizam domínios específicos para catalisar sequencialmente a condensação de ácidos carboxílicos simples (*PKS*) ou aminoácidos (*NRPS*), construindo blocos em uma cadeia crescente, de forma similar a uma linha de montagem. Cada módulo, organizado em um *cluster*, é responsável pela extensão da cadeia através do reconhecimento, ativação e incorporação de substratos específicos. A diversidade estrutural é introduzida através da variação das combinações e permutações de ambos os domínios, integrais e auxiliares (Salomon *et al.*, 2004).

Existem três principais classes de sistemas *PKS*, organizadas pelo tipo de síntese e estrutura do produto final. A *PKS* tipo I, em bactérias, é um complexo multienzimático organizado em módulos lineares individuais, cada um dos quais é responsável por uma única parte do processo de alongamento da cadeia ou modificação pós-condensação da  $\beta$ -carbonila resultante. A *PKS* tipo I que ocorre em fungos consiste numa proteína única e gigante que utiliza o mesmo conjunto de domínios em um módulo para a construção do policetídeo (Salomon *et al.*, 2004).

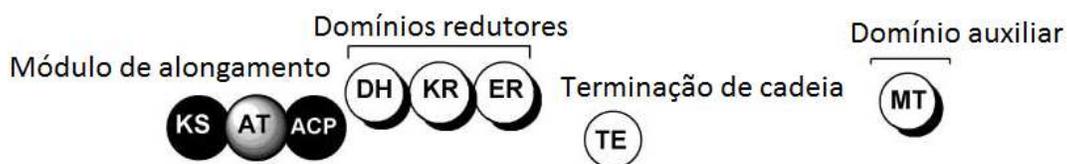
As *PKSs* tipo II são complexos de proteínas monofuncionais caracterizadas pelo uso repetitivo de um único conjunto de distintas enzimas para a construção de cadeias de policetídeo que são, então, ciclizados para produzir pequenas moléculas contendo sistemas de anéis aromáticos (Salomon *et al.*, 2004).

Um terceiro tipo de policetídeo sintase foi identificado a partir de bactérias pertencentes à chalcona e estilbeno sintase, uma família de enzimas de plantas. Estes sistemas enzimáticos, ao contrário dos sistemas do tipo I e II, contêm uma proteína, um domínio e um sítio ativo para realizar as três reações centrais da cadeia: iniciação, alongamento e ciclização (Austin & Noel, 2003).

Uma típica *PKS* modular é composta pelos domínios: aciltransferase (AT), cetosintase (KS) e proteína transportadora de acil (ACP) (Schwarzer & Marahiel, 2001,

Staunton & Weissman, 2001). Todos esses domínios estão envolvidos na síntese programada de um novo policetídeo (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005).

As ações dos domínios essenciais presentes nas *PKSs* tipos I e II são apresentados esquematicamente na Figura 1, extraída do trabalho de Salomon e colaboradores (2004).

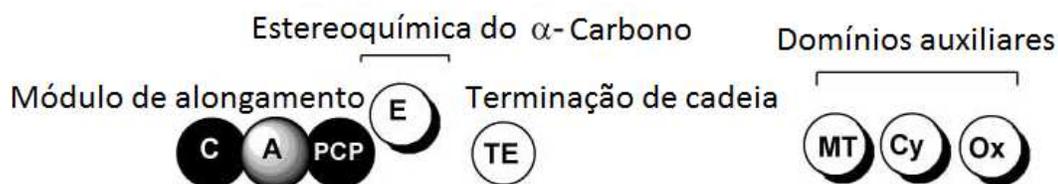


**Figura 1.** Estrutura básica de uma policetídeo sintase (KS: cetosintase, AT: acil transferase, ACP: proteína transportadora de acila, DH: desidratase, KR: cetoreductase, ER: enoil redutase, TE: tioesterase, MT: metil transferase). Imagem adaptada de Salomon e colaboradores (2004).

Por sua vez, os metabólitos peptídicos produzidos pela via não ribossomal exibem um notável espectro de atividades e são extremamente importantes como produtos farmacêuticos. Exemplos de alguns dos mais clinicamente úteis são os peptídeos antibióticos vancomicina e penicilina, o agente imunossupressor ciclosporina e o composto antitumoral bleomicina. Compostos sintetizados por *NRPSs* podem ser distinguidos pela presença de ramificações, D-aminoácidos e estrutura muitas vezes cíclica (Salomon *et al.*, 2004).

Como no sistema *PKS* tipo I, *NRPSs* são grandes complexos enzimáticos multifuncionais que constroem cadeias a partir de “blocos” selecionados individualmente. Os *NRPSs* também são organizados em módulos, cada um dos quais é responsável por um ciclo de alongamento pela incorporação de um único aminoácido no crescimento da cadeia peptídica. As ações dos domínios essenciais na *NRPS* são

apresentadas esquematicamente na Figura 2, extraída do trabalho de Salomon e colaboradores, 2004.



**Figura 2.** Estrutura básica de um peptídeo sintase não ribossomal (C: condensação, A: adenilação, PCP: proteína transportadora peptidil, E: epimerase, Cy: ciclização, Ox: oxidorreductase). Imagem adaptada de Salomon e colaboradores (2004).

Cada módulo de alongamento contém três domínios essenciais: adenilação (A), proteína transportadora de peptidil (PCP) e condensação (C), todos envolvidos no reconhecimento e condensação do substrato (Schwarzer & Marahiel, 2001). Foi demonstrado que a substituição de um domínio ou módulo dentro do complexo de multi-enzimático *PKS* e *NRPS* podem levar a um complexo funcional que irá sintetizar um novo policetídeo (Gokhale *et al.*, 1999; McDaniel *et al.*, 1999). Assim, o reconhecimento da diversidade das *PKS* e *NRPS* no ambiente é importante para a descoberta de futuras drogas e biossínteses combinatórias (Zhao *et al.*, 2008).

A detecção de sequências de genes envolvidos na síntese de metabólitos para avaliar o potencial biossintético já foi descrita em diferentes grupos taxonômicos (Christiansen *et al.*, 2001; Sigmund *et al.*, 2003).

A estrutura conservada dos domínios da *PKS* e *NRPS* permite sua detecção através de reações de polimerase em cadeia (Kennedy *et al.*, 2009). Assim, essa abordagem pode ser usada como uma técnica para selecionar micro-organismos com

potencial para a produção de metabólitos secundários (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005).

Evidências indicam que mais produtos naturais bioativos serão descobertos em micro-organismos associados a esponjas e outros invertebrados marinhos. Informações taxonômicas e bioquímicas destes micro-organismos ajudarão na busca de novos produtos naturais bioativos. Além disso, o conhecimento das vias biossintéticas dos produtos naturais pode ajudar a desenvolver rotas sintéticas químicas ou biotecnológicas para a produção destes produtos (Osinga *et al.*, 1998).

Segundo Taylor e colaboradores (2007), para estudos futuros em organismos simbióticos de esponjas, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente, a identificação e o isolamento dos micro-organismos simbióticos são um passo crucial para o futuro cultivo e produção dos metabólitos (Gaino & Sara, 1994). Em segundo lugar, a origem do produto natural só pode ser atribuída ao micro-organismo simbiótico quando a síntese for demonstrada em culturas isoladas do hospedeiro (Bewley *et al.*, 1996). Em terceiro lugar, não é certo se o micro-organismo continuará produzindo o metabólico na ausência da esponja hospedeira (Gaino & Rebora, 2003).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

A presente proposta teve por objetivo a caracterização taxonômica da diversidade de bactérias isoladas de esponjas coletadas no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, e a bioprospecção de substâncias antimicrobianas a partir destas bactérias.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização das bactérias associadas às esponjas através da análise de *fingerprinting* genômico da sequência do gene RNA ribossomal 16S (ARDRA - Amplified Ribossomal Restriction Analysis);
- Identificação das bactérias representantes de grupos distintos utilizando o sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S e análise filogenética;
- Avaliação do potencial biotecnológico dos isolados a partir da caracterização da presença ou ausência dos fragmentos dos genes que codificam as enzimas *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* através da amplificação do DNA com *primers* específicos degenerados;
- Avaliação da atividade antimicrobiana a partir de ensaio de difusão em bloco de ágar;
- Produção de extratos microbianos das bactérias isoladas de esponjas com atividade antimicrobiana a partir do ensaio de difusão em bloco de ágar;
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos microbianos pelo método de Microdiluição;
- Estruturação de uma coleção temática de bactérias associadas a esponjas, empregando metodologias de preservação de longo tempo, na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Campinas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MANUTENÇÃO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

As bactérias utilizadas neste projeto foram isoladas pela equipe da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) no âmbito do Projeto Temático FAPESP 05/60175-2, “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados”, coordenado pelo pesquisador Dr. Roberto Berlinck, IQ-USP/SC e estão mantidas na DRM/CPQBA.

As bactérias foram recuperadas de quatro esponjas marinhas, *Axinella corrugata* (AC), *Petromica citrina* (PC), *Chelonaplysilla erecta* (CE) e *Dragmacidon reticulata* (DR), coletadas no Parcel da Coroa (23473 S; 45087 W), Saco do Poço (23453 S; 45158 W), Ilha de Serraria (23484 S; 45134 W) e Ilha de Búzios (23489 S; 45089 W), respectivamente, na região de Ilha Bela, São Paulo, Brasil, em profundidades entre 5 e 15 m.

Os isolados foram preservados pelo método de ultracongelamento a - 80 °C, conforme descrito por Kirsop & Doyle (1991); Hunter-Cevera & Belt (1996) e com modificações adotadas na CBMAI (Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria).

Os isolados preservados foram reativados em 5 mL de meio de caldo nutriente e incubados a 28 °C por 24 a 48 h. Uma alíquota do crescimento foi transferida para o meio de isolamento e incubado nas mesmas condições (Anexo 1). A pureza da cultura foi verificada por observação macroscópica das colônias na placa e confirmada por observação microscópica da coloração de Gram (Halebian *et al.*, 1981)

## **4.2. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS**

A caracterização taxonômica molecular dos isolados foi baseada na análise de *fingerprinting* genômico das sequências do gene RNA ribossomal 16S, ou *ARDRA* (*Amplified Ribossomal Restriction Analysis*), seguida do sequenciamento de um fragmento deste gene para as bactérias representantes de grupos taxonômicos potencialmente distintos e análise filogenética.

### **4.2.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO**

A extração do DNA genômico dos isolados bacterianos associados às esponjas foi realizada segundo o método descrito por Pospiech & Neumann (1995), com algumas modificações. Cerca de 100 mg de biomassa da cada isolado, cultivado no meio de isolamento (Anexo 1), foram utilizados para extração do DNA genômico. As células foram recuperadas em 1 mL de tampão SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM em pH 7,5) e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso, novamente, em 0,5 mL do mesmo tampão. Foram adicionados 5 µL de solução de lizozima numa concentração final de 1 mg/mL e, em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 60 min. Posteriormente, foi adicionado 1/10 de volume de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 0,5 mg/mL de proteinase K (solução estoque 10 mg/mL), e os tubos foram incubados a 55 °C por 2 h e homogeneizados.

Foi adicionado 1/3 do volume de NaCl 5 M e 1 volume de clorofórmio. Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 min, tendo sido homogeneizados ocasionalmente. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000 rpm por 10 min e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e os tubos foram homogeneizados várias

vezes a fim de misturar as soluções ou até visualizar um precipitado fibroso branco. Os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min.

O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com 1,0 mL de etanol 70% (v/v) e, em seguida os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min entre as lavagens. O DNA precipitado foi mantido a temperatura ambiente ou em estufa a 37 °C até secar completamente. Em seguida, o DNA foi dissolvido em 200 µL de TE pH 8,0 e 10 µL de RNase (10 mg/mL) foram adicionados a suspensão. Os tubos foram incubados por 1 hora a 37 °C. Após este período, foram adicionados 20 µL de cloreto de lítio 4 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), a fim de remover as proteínas da suspensão. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min.

O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, conforme descrito anteriormente. O DNA precipitado foi seco nas mesmas condições já mencionadas e, em seguida, foi suspenso em 20 a 50 µL de água Milli-Q e estocado a 4 °C.

O DNA extraído foi quantificado através da comparação com o DNA λ em diferentes concentrações em gel de agarose a 0,8% submetido à eletroforese por 30 min em condição de 5 V por cm. Após sua quantificação, o DNA extraído foi, então, armazenado em tubos de polipropileno e mantido a temperatura de 4 °C.

#### **4.2.2. AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando os *primers* p27f e p1401r (Lane *et al.*, 1985), homólogos a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.

As condições utilizadas na reação de amplificação foram: 5 µL de tampão 10X (sem  $Mg^{+2}$ ); 1 µL de  $MgCl_2$  (2,5 mM); 0,4 µL de dNTP (2,5 mM cada); 0,75 µL de cada *primer* (20 µM); DNA para uma concentração final de 50-100 ng; 4 U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen); e água Milli-Q esterilizada completando o volume para 50 µL de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos sendo: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, extensão final de 3 min a 72 °C, em termociclador *Eppendorf*®.

#### **4.2.3. ARDRA (Amplified Ribosomal Restriction Analysis)**

Os produtos de amplificação correspondentes ao gene que codifica o RNA ribossomal 16S foram utilizados em reações independentes de restrição enzimática, utilizando as enzimas *HhaI* (GE Healthcare), *AluI* (GE Healthcare) e *DdeI* (Promega), visando à obtenção de perfis de bandas polimórficos para tipagem das linhagens em nível de espécie e/ou gênero. As reações de digestão foram realizadas conforme a recomendação dos fabricantes das enzimas utilizadas. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5 % em tampão TAE 1X para visualização do perfil de bandas.

As imagens dos géis com perfis de bandas foram analisadas pelo programa GelCompar (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium), após a conversão e a normalização dos perfis com o padrão de peso molecular (100 pb, MBI Fermentas). Os perfis de bandas foram combinados e analisados em conjunto pelo coeficiente de DICE usando o algoritmo UPGMA (Dice, 1945).

As linhagens que apresentaram perfis de bandas distintos, ou seja, representativos de grupos taxonômicos diferentes, tiveram o gene RNA ribossomal 16S

sequenciado para inferência filogenética. Foram considerados representativos de um mesmo ribotipo os isolados com similaridade igual ou maior que 97%.

#### **4.2.4. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S**

Após análise dos perfis gerados, os produtos da amplificação de isolados potencialmente distintos foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA & gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Health Care). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Health Care), utilizando os *primers* internos p10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'), p765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3'), p782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3') e p1100r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3').

As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas para cada isolado foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) através do programa Phrep/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998, Ewing *et al.*, 1998, Gordon *et al.*, 1998, Gordon, 2004) e, em seguida, comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do Ribossomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

As sequências do gene RNA ribossomal 16S recuperadas relacionadas à sequência do gene para o organismo desconhecido foram selecionadas para alinhamento no programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994) e as análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a

árvore filogenética construída a partir das distâncias evolutivas calculadas pelo método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* a partir de 1000 reamostragens.

#### 4.3. AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *PKS I*, *PKS II* E *NRPS*

A avaliação das bactérias isoladas de esponjas com potencial biotecnológico foi realizada a partir da amplificação dos genes *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* com *primers* degenerados descritos na literatura (Metsa Ketela *et al.*, 1999; Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005) (Tabela 1).

**Tabela 1.** *Primers* selecionados para amplificação de fragmentos dos genes dos sistemas *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* de bactérias isoladas de esponjas marinhas.

Gene	Primer	Sequência 5' 3'	Tamanho Fragmento (pb)	Referência
<b><i>PKS I</i></b>	PKSI_JF	TSAAGTCSAACATCGGBCA	1200-1400	Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005
	PKSI_JR	CGCAGGTTSCSGTACCGTA		
<b><i>PKS II</i></b>	PKSII_JF	TSGCSTGCTTCGAYGCSATC	600-700	Metsa-Ketela <i>et al.</i> , 1999
	PKSII_JR	TGGAANCCGCCGAABCCGCT		
<b><i>NRPS</i></b>	NRPS_JF	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700	Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005
	NRPS_JR	SASGTCVCCSGTSCGGTAS		

A reação amplificação consistiu em 2,5 µL de tampão 10X (sem Mg<sup>+2</sup>); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 2,5 nM; 0,2 µL de dNTP's (2,5 nM cada); 0,4 µL de cada *primer* (20 µM), 3-5 µL de DNA (50-100 ng); 4 U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen); e água Milli-Q esterilizada completando o volume para 50 µL de reação. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos a 95 °C por 1 min,

55 °C por 2 min e 72 °C por 2 min; com uma extensão final de 72 °C por 10 min, em termociclador *Eppendorf*®.

Os produtos esperados na reação de amplificação foram analisados e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,2 % conforme descrito anteriormente.

#### **4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A atividade antimicrobiana das bactérias associadas às esponjas foi avaliada por dois métodos distintos: o ensaio de difusão em bloco de ágar (Ichikawa *et al.*, 1971) e a determinação da concentração inibitória mínima pelo método de Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2003).

##### **4.4.1. MÉTODO DA DIFUSÃO EM BLOCO DE ÁGAR**

A atividade antimicrobiana dos isolados de esponjas marinhas foi avaliada pelo método de difusão em bloco de ágar contra os seguintes micro-organismos indicadores: as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 701, *Micrococcus luteus* CBMAI 825, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231.

O procedimento consistiu inicialmente no cultivo das bactérias associadas às esponjas nos respectivos meios de isolamento (Anexo 1). Concomitantemente, as bactérias indicadoras foram cultivadas em meio Müller-Hinton (MH) (Difco) e a levedura indicadora em Sabouraud Dextrose (SD) (Oxoid), ambos incubados por 24 h a 37 °C.

Após o crescimento, foi padronizada uma suspensão de células dos micro-organismos-teste na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e  $5 \times 10^5$  UFC/mL

para as bactérias e leveduras respectivamente, de acordo com a escala de McFarland. Em seguida, 150 µL dessa solução foram semeados nos meios sólidos (AMH e SDA).

Blocos de Ágar circulares de seis mm de diâmetro das bactérias isoladas de esponjas foram, então, transferidos para as placas contendo os micro-organismos indicadores inoculados. O teste foi realizado em triplicata para todas as bactérias isoladas.

As placas foram incubadas a 37 °C e foram efetuadas leituras após 24 h e após 96 h, sendo a medida do halo tomada após a segunda leitura. Com o valor obtido, em mm, foi calculada a média e os resultados foram analisados pela escala sugerida por Matsuura (2004) (Tabela 2). O controle do experimento foi realizado inoculando-se somente blocos de ágar do meio de cultura (sem os micro-organismos isolados) sobre os micro-organismos indicadores.

**Tabela 2.** Escala de classificação de halos de inibição segundo Matsuura (2004).

<b>Tipo de inibição</b>	<b>Tamanho do halo de inibição</b>	<b>Intensidade da inibição</b>
Ausente	0	-
Baixa	7-10 mm	+
Moderada	11-14 mm	++
Alta	> 14 mm	+++

#### **4.4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO BRUTO DAS BACTÉRIAS**

A determinação da concentração inibitória mínima foi efetuada com os extratos orgânicos brutos das bactérias selecionadas pelo método de difusão em bloco de ágar.

Os extratos orgânicos brutos foram preparados na Divisão de Microbiologia e na Divisão de Fitoquímica, do CPQBA/UNICAMP. A fase final da preparação dos extratos foi realizada com a orientação do Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck e da Dra.

Miriam Harumi Kossuga do Laboratório de Química, no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Extratos derivados do metabolismo dos isolados das bactérias com potencial antimicrobiano foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido. Um pré-inóculo dos isolados foi cultivado em sete mL do meio de isolamento e incubado a 30 °C por 24 h a 100 rpm. Após o crescimento da cultura, o volume total foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* contendo 50 mL do mesmo meio e mantidos a mesma temperatura e rotação por 24 h. Novamente, 50 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para um frasco de vidro contendo 500 mL do mesmo meio e mantidos nas mesmas condições citadas por sete dias. Após esse período 500 mL de acetato de etila foram adicionados e a mistura foi triturada em liquidificador de alta rotação. Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação a 100 rpm por 24 h.

Inicialmente, a mistura foi filtrada em funil de Buchner contendo uma camada de celite e, em seguida, a fase orgânica foi recuperada em um Erlenmeyer utilizando-se um funil de separação. Na fase aquosa ficaram retidos os fragmentos celulares e o meio de cultura e na fase orgânica foram recuperados os possíveis metabólitos biologicamente ativos.

A fase orgânica foi, então, filtrada em algodão e transferida para um balão de fundo redondo. Os extratos brutos contidos na fase orgânica foram concentrados no rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi) a vácuo na temperatura de 37 °C, até completa secagem do solvente. Em seguida, os extratos foram ressuspensos em álcool metílico, filtrados com algodão e o volume transferido para novos tubos de vidro com pipeta de Pasteur. Estes tubos foram levados a centrífuga a vácuo Savant, modelo Speedvac® Plus SC 210A para evaporação. Após a completa secagem do solvente, os extratos foram dissolvidos em DMSO 10% em meio AMH e mantidos a 4 °C até o uso nos ensaios de atividade antimicrobiana.

#### 4.4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada em colaboração com a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte na Divisão de Microbiologia, CPQBA/UNICAMP, conforme método de Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2003) estabelecido na Divisão.

Nos testes de atividade antimicrobiana os extratos orgânicos brutos das bactérias associadas às esponjas foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) a 10% no meio de cultivo AMH e a concentração máxima testada foi de 2 mg/mL.

A atividade antimicrobiana dos extratos dos isolados neste estudo foi avaliada frente aos micro-organismos indicadores: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os micro-organismos indicadores foram preservados em meios de cultura específicos, *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid) ou *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid) para bactérias e *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Cultlab) para a levedura. Os micro-organismos indicadores foram e repicados 24 h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e incubados em estufa a 37 °C para crescimento.

Os inóculos dos micro-organismos indicadores para os testes de atividade antimicrobiana foram preparados a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução salina 0,85 %, sendo a densidade óptica acertada em espectrofotômetro até turbidez correspondente a uma absorbância entre 0,08 e 0,1 a 625 nm, correspondente a  $10^8$  células / mL. Em seguida, foi realizada uma diluição para concentração final de  $10^5$  células/mL de cada micro-organismo.

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100  $\mu$ L do meio de cultura AMH. Na coluna 1 - linha A, foram acrescentados 100  $\mu$ L da solução do extrato a ser testado, de concentração conhecida (2 mg/mL). Em seguida, 100  $\mu$ L de outra amostra foram adicionados na linha B e assim sucessivamente, resultando num extrato diferente no primeiro poço de cada linha. O conteúdo dos orifícios foi homogeneizado com o meio e transferidos para o orifício da coluna seguinte (2), repetindo-se este procedimento até a coluna 12, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato em cada poço. Os 100  $\mu$ L finais foram desprezados. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L do inóculo pré-padronizado do micro-organismo a ser avaliado. Foram realizados controles negativos dos extratos e do meio, bem como controle positivo do micro-organismo indicador. As placas foram, então, incubadas a 37 °C e os resultados obtidos após 24 h e 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após este período, para as bactérias, foram acrescentados 50  $\mu$ L de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5%, e a placa foi reincubada por 3 h a mesma temperatura. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida pelo TTC quando as células bacterianas apresentam atividade respiratória. No caso da levedura, o próprio meio RPMI tem sua coloração alterada de rosa para amarelo quando há crescimento da levedura devido à alteração do pH do meio. Assim, a placa já pode ser lida logo após 24 h de incubação.

Com base nos níveis de inibição propostos para classificar materiais vegetais e adaptados para extratos de micro-organismos, foram considerados como forte inibição as CIMs que inibiram o crescimento bacteriano com concentração de até 0,5 mg/mL; inibição moderada os que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano com

concentrações entre 0,6 e 1,5 mg/mL e fraca inibição quando a inibição só era observada com concentrações acima de 1,6 mg/mL (Aligianis *et al.*, 2001).

#### **4.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA/FUNGICIDA MÍNIMA (CBM/CFM)**

A determinação da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) foi obtida após o plaqueamento de 10 µL da suspensão onde não houve crescimento visual bacteriano/fúngico detectado na microplaca, em meio TSA (*Tryptone Soya Broth*) (Oxoid) para bactérias e SDA (*Sabouraud Destrose Agar*) (Oxoid) para a levedura. As placas foram incubadas a 37 °C e o crescimento dos micro-organismos foi avaliado após 48 h.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS

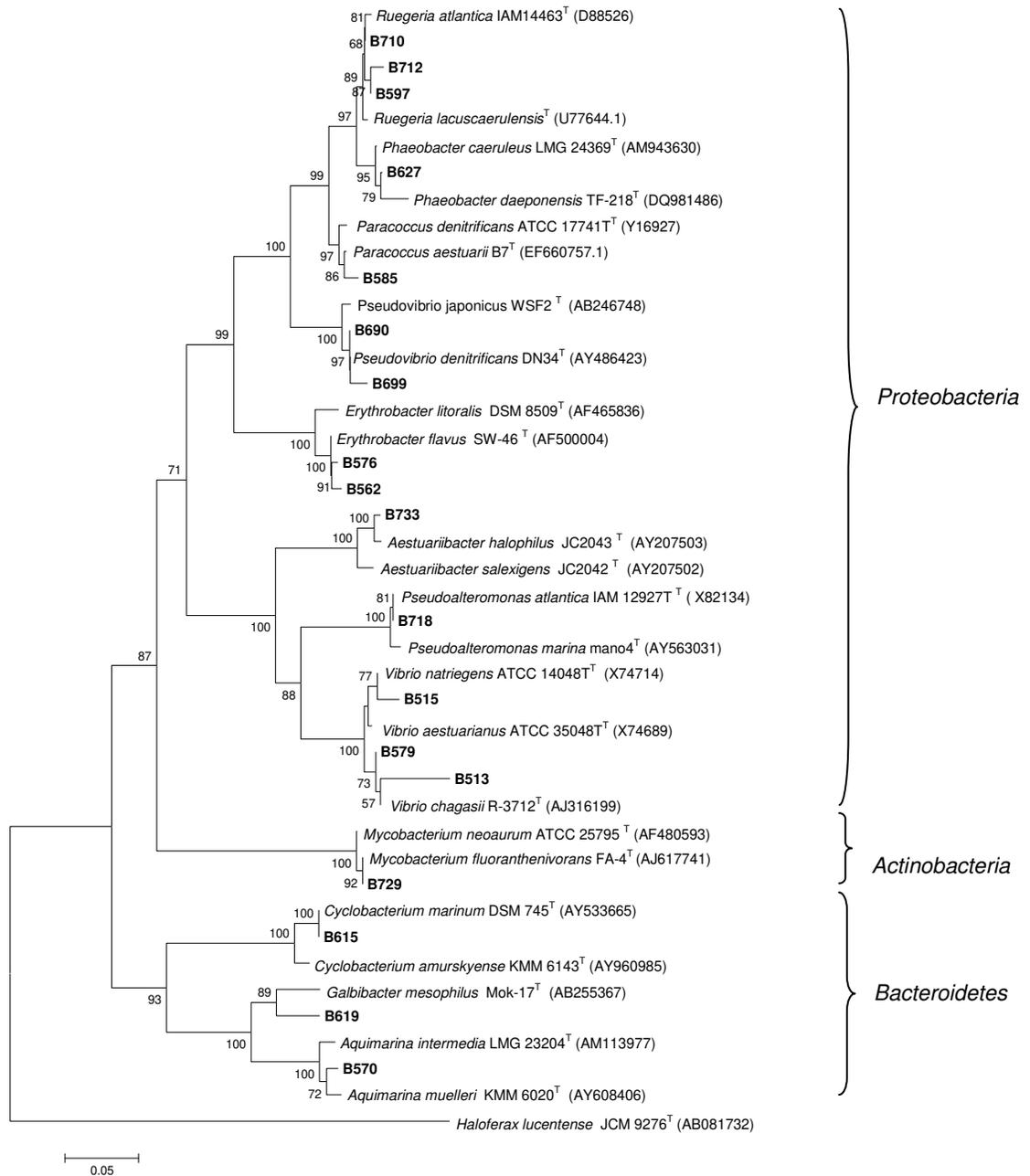
Um total de 86 bactérias isoladas de quatro espécies de esponjas marinhas foi caracterizado no presente trabalho. Um conjunto de 43 diferentes ribotipos bacterianos foi revelado por análises de ARDRA. Dentre as bactérias isoladas, 31 foram da esponja *Petromica citrina* (36%), incluindo 10 ribotipos únicos, 14 de *Dragamacidon reticulata* (16,27%), dos quais 9 eram únicos, 8 de *Axinella corrugata* (9,3%), com 6 únicos, e 33 de *Chelonaplysilla erecta* (38,37%), dentre os quais 18 perfis de ARDRA eram únicos.

A análise baseada no sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S mostrou que as bactérias marinhas isoladas estão relacionadas a 15 gêneros, distribuídos entre os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (Figura 3 e Apêndice 1) e *Firmicutes* (Figura 4 e Apêndice 1). As bactérias isoladas anteriormente a este estudo foram depositadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria, na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP, Campinas/SP (CBMAI 1200-1212, 1214-1218 e 1220-1226) (Tabela 3 e Apêndice 1).

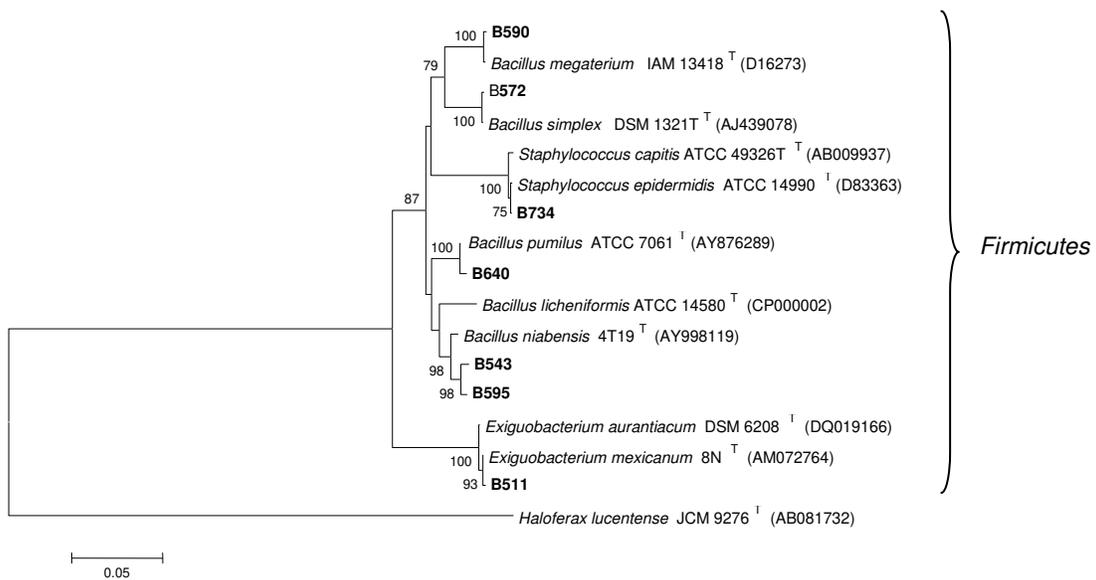
O filo *Proteobacteria* inclui representantes da classe *Alphaproteobacteria*, como os gêneros *Ruegeria*, *Phaeobacter*, *Paracoccus*, *Pseudovibrio* e *Erithrobacter*, e membros pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* como *Pseudoalteromonas*, *Aestuariibacter* e *Vibrio*. O filo *Actinobacteria* foi representado pelo gênero *Mycobacterium* e os gêneros *Aquimarina* e *Galibacter*. No filo *Bacteroidetes* foram isolados membros do gênero *Cyclobacterium* (Figura 3 e Apêndice 1). Finalmente, o filo *Firmicutes* foi representado pelos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Exiguobacterium* (Figura 4 e Apêndice 1).

O gênero *Pseudovibrio* foi o único presente em todas as esponjas amostradas. Os gêneros *Bacillus*, *Ruegeria*, *Vibrio*, *Staphylococcus* e *Erythrobacter* estavam

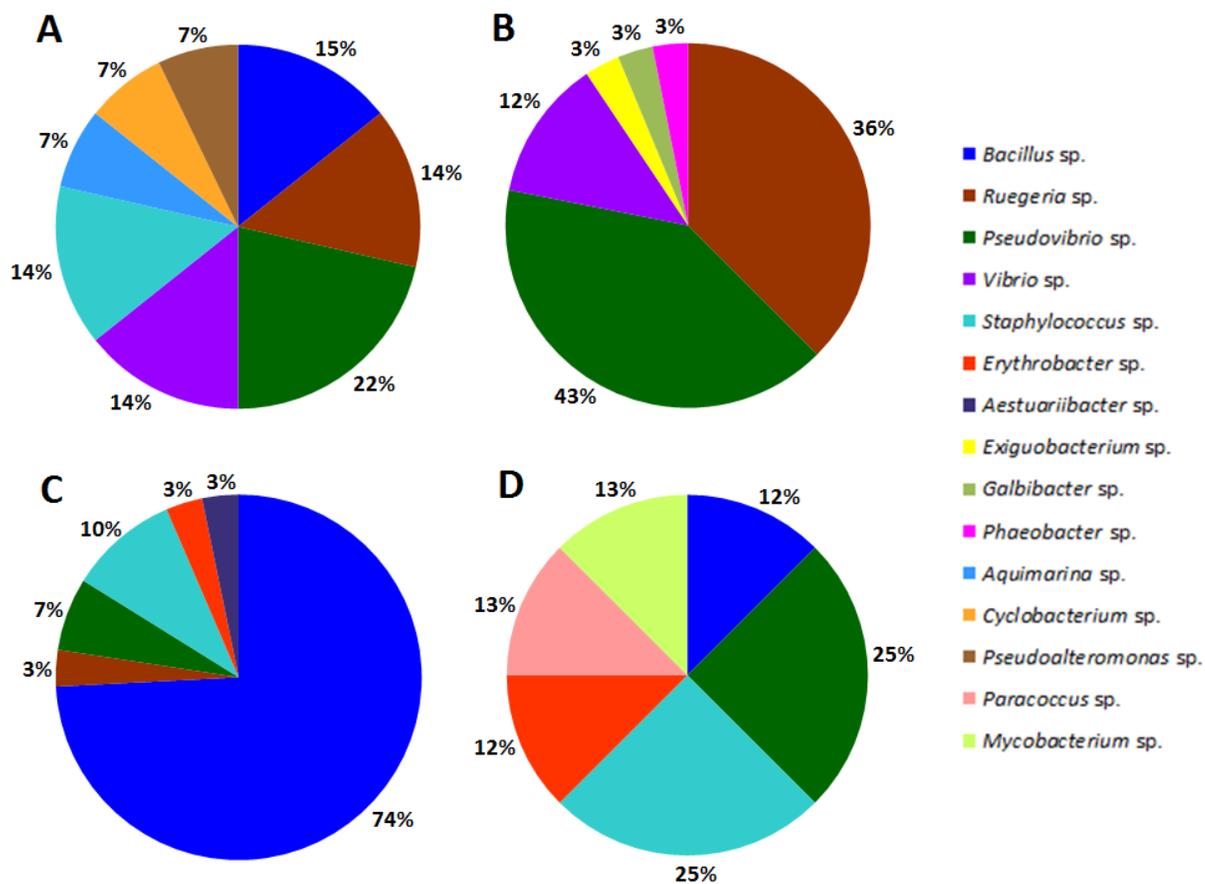
presentes em mais de uma esponja amostrada. Além disso, vários gêneros de bactérias foram isolados exclusivamente de um hospedeiro (Figura 5). A maior diversidade de bactérias foi obtida a partir da esponja *Dragmacidon reticulata*, que abrigou oito gêneros de bactérias, sendo que as demais esponjas abrigaram apenas seis gêneros distintos cada (Figura 3 e Apêndice 1).



**Figura 3.** Árvore filogenética baseada em análises da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* isoladas de esponjas. Distâncias evolutivas foram baseadas em modelo de Kimura 2p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 re-amostragens. *Haloferax lucentense*<sup>T</sup> (AB081732) foi utilizada como *outgroup*.



**Figura 4.** Árvore filogenética baseada em análises da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* isoladas de esponjas. Distâncias evolutivas foram baseadas em modelo de Kimura 2p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 re-amostragens. *Haloferax lucentense*<sup>T</sup> (AB081732) foi utilizada como *outgroup*.



**Figura 5.** Diversidade de bactérias recuperadas das esponjas *Dragmacidon reticulata* (A.) (14 isolados), *Chelonaplysilla erecta* (B.) (33 isolados), *Petromica citrina* (C.) (31 isolados) e *Axinella corrugata* (D.) (8 isolados).

## 5.2. AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *PKS I*, *PKS II* E *NRPS*

Três conjuntos de *primers* degenerados, dois deles codificando fragmentos dos genes das poliketídeo sintases (*PKS-I* e *II*) e um o fragmento do gene da peptídeo sintetase não ribossomal (*NRPS*) foram utilizados para avaliação do potencial biossintético das 86 bactérias. A detecção desses genes proporciona uma evidência indireta da diversidade química do potencial biotecnológico dessas bactérias.

Sequências alvo de *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* foram amplificadas em 21 (24,13%), 45 (51,72%) e 21 (24,13%) dos isolados, respectivamente (Tabela 3 e Apêndice 1). A maioria (54) dos isolados (62, 79%) mostrou a presença de pelo menos um dos genes (Tabela 3 e Apêndice 1).

**Tabela 3.** Caracterização molecular e avaliação do potencial biotecnológico por meio da amplificação dos fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* de bactérias cultiváveis recuperadas de esponjas marinhas.

Isolados <sup>a</sup>	Número de acesso <sup>b</sup>	Identificação <sup>c</sup>	Isolados similares <sup>d</sup>	Genes alvo <sup>e</sup>		
				PKS-I	PKS-II	NRPS
<b>B511</b>	CBMAI 1200	<i>Exiguobacterium</i> sp.	-	-	+	+
<b>B513</b>	CBMAI 1201	<i>Vibrio</i> sp.	B582	-	-	-
<b>B515</b>	CBMAI 1202	<i>Vibrio</i> sp.	-	+	+	-
			B518	+	-	-
<b>B543</b>	CBMAI 1203	<i>Bacillus</i> sp.	B544, B555, B584, B587, B624, B709	-	+	-
			B516, B517, B526, B547, B558, B565, B616, B695, B707	-	-	-
			B593	-	-	+
			B601, B608, B715	-	+	+
<b>B562</b>	CBMAI 1204	<i>Erythrobacter</i> sp.	-	+	-	-
<b>B570</b>	CBMAI 1205	<i>Aquimarina</i> sp.	-	-	-	-
<b>B572</b>	CBMAI 1206	<i>Bacillus simplex</i>	-	-	-	-
<b>B576</b>	CBMAI 1207	<i>Erythrobacter</i> sp.	-	-	+	-
<b>B579</b>	CBMAI 1208	<i>Vibrio</i> sp.	-	-	+	-
			B523	-	-	-
<b>B585</b>	CBMAI 1209	<i>Paracoccus</i> sp.	-	-	+	-
<b>B590</b>	CBMAI 1210	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	-
<b>B595</b>	CBMAI 1211	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	+	-
			B602	+	+	-
<b>B597</b>	CBMAI 1212	<i>Ruegeria</i> sp.	B730	+	+	-

**Tabela 3.** Continuação.

Isolados <sup>a</sup>	Número de acesso <sup>b</sup>	Identificação <sup>c</sup>	Isolados similares <sup>d</sup>	Genes alvo <sup>e</sup>		
				PKS-I	PKS-II	NRPS
			B548, B556, B711	-	-	-
			B575	-	+	+
			B626	-	+	-
			B666	+	-	-
<b>B615</b>	CBMAI 1214	<i>Cyclobacterium marinum</i>	-	+	-	-
<b>B619</b>	CBMAI 1215	<i>Galbibacter</i> sp.	-	-	+	-
<b>B627</b>	CBMAI 1216	<i>Phaeobacter</i> sp.	-	-	-	-
<b>B640</b>	CBMAI 1217	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	+	-
			B722	-	+	+
<b>B690</b>	CBMAI 1218	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	-	-
<b>B699</b>	CBMAI 1220	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	B698	-	-	+
			B630, B657, B659, B618	-	-	-
			B672	+	-	-
			B605, B634, B667, B700, B701	-	+	+
			B540	-	+	-
			B538, B675	+	+	-
			B632, B636, B646, B661, B664,	+	+	+
<b>B710</b>	CBMAI 1221	<i>Ruegeria</i> sp.	-	+	+	+
			B552, B647, B680, B721	-	-	-

**Tabela 3.** Continuação.

Isolados <sup>a</sup>	Número de acesso <sup>b</sup>	Identificação <sup>c</sup>	Isolados similares <sup>d</sup>	Genes alvo <sup>e</sup>		
				PKS-I	PKS-II	NRPS
<b>B712</b>	CBMAI 1222	<i>Ruegeria</i> sp.	-	+	+	-
			B684	+	-	-
<b>B718</b>	CBMAI 1223	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	-	+	+	-
<b>B729</b>	CBMAI 1224	<i>Mycobacterium</i> sp.	-	+	+	+
<b>B733</b>	CBMAI 1225	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	-	-	+	-
<b>B734</b>	CBMAI 1226	<i>Staphylococcus</i> sp.	B532, B591, B727	-	-	-
			B534, B535, B536	-	+	-

<sup>a</sup> Número dos isolados bacterianos representantes de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) distintas;

<sup>b</sup> Número de acesso da cultura na CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria);

<sup>c</sup> Identificação com base na análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S;

<sup>d</sup> Isolados com 97% de similaridade obtidos a partir da análise da matriz de distância e ARDRA usando o modelo de substituição de DNA descrito por Kimura (1980).

<sup>e</sup> Presença (+) ou ausência (-) dos fragmentos dos genes alvo *PKS-I*, *II* e *NRPS*. A primeira linha corresponde a cada isolado representante de UTOs distinta.

### **5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

#### **5.3.1. MÉTODO DA DIFUSÃO EM BLOCO DE ÁGAR**

A triagem do potencial antimicrobiano foi realizada para as 86 bactérias identificadas. No ensaio em bloco de ágar, a formação do halo de inibição ocorreu em 21 amostras (24,4%) frente os micro-organismos indicadores *M. luteus* CBMAI 825 e *B. subtilis* CBMAI 707 (Tabela 4 e Apêndice 1).

**Tabela 4.** Média e classificação do tamanho halo de inibição das bactérias isoladas de esponjas frente à bactéria indicadora *Micrococcus luteus* CBMAI 825 (Indicadora 1) e *B. subtilis* CBMAI 707 (Indicadora 2).

Isolado	Média do halo (em mm)		Classificação segundo Matsuura		Identificação Taxonômica
	Indicadora 1	Indicadora 2	Indicadora 1	Indicadora 2	
<b>B511</b>	13	-	++	-	<i>Exiguobacterium</i> sp.
<b>B515</b>	20.3	11,7	+++	++	<i>Vibrio</i> sp.
<b>B516</b>	7	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B517</b>	5.3	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B526</b>	6.3	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B543</b>	16	-	+++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B544</b>	12.7	-	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B555</b>	8.3	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B558</b>	10	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B565</b>	11.3	-	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B584</b>	13.3	-	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B587</b>	12.3	-	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B593</b>	12.3	-	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B616</b>	15	-	+++	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B618</b>	16.7	-	+++	-	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>
<b>B624</b>	9.7	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
<b>B640</b>	10.3	-	+	-	<i>Bacillus pumilus</i>
<b>B695</b>	9.7	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.

**Tabela 4.** Continuação.

Isolado	Média do halo (em mm)		Classificação segundo Matsuura		Identificação Taxonômica
	Indicadora 1	Indicadora 2	Indicadora 1	Indicadora 2	
<b>B699</b>	17.7	-	+++	-	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>
<b>B700</b>	8.5	-	+	-	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>
<b>B707</b>	7.0	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.

\*Escala de classificação segundo o tamanho do halo de inibição sugerida por Matsuura (2004).

### **5.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)**

Os ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima foram realizados para os 21 extratos de bactérias previamente selecionadas pelo método do bloco de ágar. Dos 21 extratos de bactérias testados nenhum inibiu o crescimento das bactérias indicadoras *P. aeruginosa* ATCC 13388, *M. luteus* ATCC 4698, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. choleraesuis* ATCC 10708 e da levedura *C. albicans* ATCC10231. Entretanto, 13 dos 21 extratos testados inibiram o crescimento bactéria indicadora *B. subtilis* ATCC 6051 e apenas um extrato inibiu o crescimento da *E. coli* ATCC 11775 (Tabela 5).

Dos 13 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, sete isolados (B511, B515, B543, B544, B593, B624 e B695) demonstraram a presença de pelo menos um dos genes avaliados (Tabela 5). Alguns isolados (B516, B526, B558, B565, B616 e B707) que apresentaram atividade antimicrobiana através da determinação da CIM não foram positivos para a amplificação dos fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* (Tabela 5).

### **5.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)**

A CBM foi determinada para cinco extratos orgânicos brutos (B515, B593, B616, B624 e B695) cuja inibição de crescimento ocorreu frente ao *B. subtilis* ATCC 6051 e para um extrato (B616) que inibiu o crescimento da bactéria *E. coli* ATCC 11775 (Tabela 5 e Apêndice 1). Estes isolados demonstraram, considerando as concentrações testadas, uma concentração capaz de matar 99,9% das bactérias indicadoras em questão (*B. subtilis* e *E. coli*), possuindo ação bactericida nessas concentrações. Os demais extratos, embora demosntrassem atividade antimicrobiana pela determinação da CIM, não foram capazes de matar os micro-organismos

indicadores nas concentrações estudadas, apenas de inibir seu crescimento (ação bacteriostática).

Ambas as ações bacteriocida e bacteriostática são úteis no tratamento de doenças infecciosas, uma vez que nem sempre eliminar totalmente o micro-organismo causador é a melhor opção.

Como nenhum isolado apresentou CIM frente a levedura *C. albicans* ATCC10231, conseqüentemente nenhum isolado foi testado para a CFM, conforme proposto na metodologia.

**Tabela 5.** Bactérias isoladas de esponjas marinhas que demonstraram atividade antimicrobiana pela determinação da CIM contra os micro-organismos *B. subtilis* ATCC 6051 e *E. coli* ATCC 11775, e seus resultados de amplificação para os fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*.

Isolado	Identificação	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>PKS-I</i>	<i>PKS-II</i>	<i>NRPS</i>
		CIM* (mg/mL)	CBM** (mg/mL)	CIM* (mg/mL)	CBM** (mg/mL)			
B511	<i>Exiguobacterium</i> sp.	2	-	-	-	-	+	+
B515	<i>Vibrio</i> sp.	1	2	-	-	+	+	-
B516	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-
B526	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-
B543	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	+	-
B544	<i>Bacillus</i> sp.	1	-	-	-	-	+	-
B558	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-
B565	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-
B593	<i>Bacillus</i> sp.	1	2	-	-	-	-	+
B616	<i>Bacillus</i> sp.	0,5	2	0,5	2	-	-	-
B624	<i>Bacillus</i> sp.	2	2	-	-	-	+	-
B695	<i>Bacillus</i> sp.	2	2	-	-	-	+	-
B707	<i>Bacillus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-

\* Concentração inibitória mínima (CIM)

\*\* Concentração bactericida mínima (CBM)

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS

A abordagem utilizada neste estudo resultou na caracterização de 86 bactérias isoladas de quatro esponjas marinhas, *Chelonaplysilla erecta*, *Dragmacidon reticulata*, *Axinella corrugata* e *Petromica citrina*, distribuídas em 43 ribotipos distintos. A análise baseada no sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S mostrou a presença de gêneros relacionados aos filos *Proteobacteria* (*Alfa* e *Gama-proteobacteria*), *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, corroborando dados da literatura (Taylor *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2010).

No presente trabalho, 24,4% dos isolados apresentaram estreita relação filogenética com a espécie *Pseudovibrio denitrificans*. Esta espécie foi isolada pela primeira vez em 2004 a partir de uma amostra de água do mar coletada na região costeira rasa da Baía Nanwan, Parque Nacional de Kenting, Taiwan (Shieh *et al.*, 2004). O gênero *Pseudovibrio* compreende um táxon de bactérias heterotróficas e anaeróbicas facultativas que parece ser muito comumente encontrado em associação com organismos marinhos, incluindo esponjas marinhas, ascídias e tunicados (Hentschel *et al.*, 2001; Webster & Hill 2001; Thiel & Imhoff, 2003; Shieh *et al.*, 2004; Enticknap *et al.*, 2006; Fukunaga *et al.*, 2006; Sertan-de Guzman *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2010).

Enticknap e colaboradores (2006) relataram a estreita relação de isolados de *Alphaproteobacteria* proximamente relacionados com a espécie *Pseudovibrio denitrificans* em sete gêneros de esponjas marinhas coletadas em Key Largo, Flórida, USA, sugerindo que estas bactérias são transferidas entre gerações através da fase larval nas espécies de esponjas.

A estreita relação entre esponjas e o gênero *Pseudovibrio* também foi relatada por Webster e colaboradores (2001), que isolaram *P. denitrificans* apenas em esponjas saudáveis, estando ausentes em espécimes doentes. Enticknap e colaboradores (2006) acreditam que essa espécie seja um simbiote verdadeiro. Esta relação simbiótica é apoiada por um estudo de separação de células, no qual as células de *P. denitrificans* foram sempre encontradas em frações que continham células da esponja *Rhopaloeides odorabile* indicando que a bactéria pode se localizar intracelularmente ou estar fortemente associada à superfície das células da esponja hospedeira (Webster et al., 2001). No entanto, Muscholl-Silberhorn e colaboradores (2008) acreditam que a associação do gênero *Pseudovibrio* com esponjas é, provavelmente, evolutivamente jovem e facultativa e, possivelmente, envolve a produção de metabólitos secundários ativos.

Além disso, foi encontrado em *P. denitrificans* isolado da esponja *Haliclona simulans* um grupo de *amplicons* relacionados à síntese de ácidos graxos envolvidos na produção de um polissacarídeo capsular (Kennedy et al., 2009). Em rizóbios, a produção de polissacarídeo capsular está ligada a capacidade de formar uma relação simbiótica com a planta (Parada et al., 2006), e um mecanismo semelhante pode estar envolvido na relação simbiótica entre os pseudovibrios e as esponjas (Kennedy et al., 2009).

No nosso estudo, representantes do gênero *Pseudovibrio* foram isolados em todas as esponjas estudadas. Considerando que estas bactérias têm sido descritas como simbioses de esponjas e que o isolamento foi feito a partir de pedaços triturados das mesmas, era de se esperar a recuperação de muitos isolados de *Pseudovibrio*.

O segundo gênero mais abundante recuperado neste estudo foi o gênero *Bacillus*. Representantes deste gênero estiveram presentes em três das quatro esponjas analisadas, sendo responsável por mais de 70% dos isolados recuperados da

esponja *Petromica citrina*, endêmica do litoral brasileiro. Embora o gênero *Bacillus* seja considerado tipicamente terrestre, membros deste gênero têm sido isolados de ambiente marinho em inúmeras ocasiões (Sfanos *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2010).

Espécies de *Bacillus* são frequentemente isoladas de sedimentos e invertebrados marinhos (Pabel *et al.*, 2003), e são conhecidas por gerar endósporos em condições adversas, tais como aquelas encontradas nos ecossistemas marinhos (Hentschel *et al.*, 2001). No ambiente marinho, os membros do gênero *Bacillus*, conhecidos pela produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas ou citotóxicas, foram regularmente isolados de invertebrados e, portanto, apresentam um elevado potencial na busca de novas substâncias antimicrobianas (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

No nosso estudo, o gênero *Staphylococcus* esteve presente em três das esponjas coletadas no litoral brasileiro. Embora, possa parecer que estes isolados sejam contaminantes do processo de isolamento, dados da literatura relatam repetidamente a associação dos membros do gênero *Staphylococcus* em esponjas marinhas (Sfanos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2010).

Outro representante do filo *Firmicutes* foi encontrado em associação com a esponja *Chelonaplysilla erecta*. Este gênero, denominado *Exiguobacterium*, foi proposto pela primeira vez em 1983 para caracterizar uma bactéria isolada de efluentes do processamento da batata (Collins *et al.*, 1983). Desde então, o gênero já foi encontrado em uma variedade de ambientes, incluindo o *permafrost* da Sibéria (Rodrigues *et al.*, 2006), o McMurdo Dry Valleys na Antártica (Chaturvedi *et al.*, 2008) e associado a esponjas marinhas (Menezes *et al.*, 2010).

Representante do filo *Proteobacteria*, o gênero *Ruegeria*, ordem *Rhodobacterales* foi proposto por Uchino e colaboradores em 1998 e é composto por bactérias Gram-

negativas, aeróbicas que requerem NaCl ou sais marinhos para crescimento. A maioria das espécies representantes do gênero *Ruegeria* foram isoladas do ambiente marinho ou de outros ambientes salinos (Muramatsu *et al.*, 2007), e sua presença já foi relatada em associação com esponjas marinhas (Sfanos *et al.*, 2005). No presente trabalho, os representantes deste táxon foram recuperados de três dentre as quatro esponjas coletadas. Cabe resaltar que os meios de cultivo utilizados para isolamento das bactérias associadas às esponjas foram preparados com água do mar artificial, portanto, a quantidade de sal nestes meios foi relativamente mais alta que o normal (dados não apresentados). Assim, era de se esperar que micro-organismos tolerantes à salinidade, tais como membros do gênero *Ruegeria*, fossem comuns neste estudo.

A esponja *Axinella corrugata* do presente trabalho apresentou um isolado do gênero *Paracoccus*. O gênero *Paracoccus* pertence ao grupo das alfaproteobactérias e foi proposto pela primeira vez em 1969 (Davis *et al.*, 1969). As espécies desse gênero são Gram-negativas e metabolicamente versáteis (Kelly *et al.*, 2006b). Mais de 20 espécies de *Paracoccus* já foram descritas e novas espécies vêm sendo descritas a cada ano. As diferentes espécies foram isoladas de diversos ambientes incluindo solo, sedimento, lodo ativado, água do mar e em associação com esponja marinha (Kelly *et al.*, 2006a; Kelly *et al.*, 2006b; Osanjo *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2009, Sfanos *et al.*, 2005).

O gênero *Erythrobacter* foi proposto por Shiba & Simidu (1982) para classificar uma bactéria Gram negativa, aeróbia e quimio-organotrófica. As espécies deste gênero contêm bacterioclorofila A e carotenóides, responsáveis pela coloração vermelha ou alaranjada das colônias (Shiba & Simidu, 1982; Yurkov *et al.*, 1994). Muitas espécies do gênero foram isoladas de ambientes marinhos (Shiba & Simidu, 1982; Yurkov *et al.*, 1994; Denner *et al.*, 2002), e muitas delas não crescem na ausência de NaCl (Yoon *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2004). O gênero já foi descrito em associação com estrela do

mar, corais (Ivanova *et al.*, 2005) e esponjas marinhas (Sfanos *et al.*, 2005), entretanto, a relação com estes organismos é, ainda, desconhecida. Em nossos estudos, representantes deste gênero foram recuperados das esponjas *Petromica citrina* e *Axinella corrugata*.

Estudos sobre o grupo *Roseobacter*, um clado marinho funcionalmente diverso frequentemente associado a hospedeiros eucarióticos, sugerem que candidatos deste grupo sejam excelentes para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Por exemplo, uma grande proporção de indivíduos desse clado contem os genes da *PKS* e *NRPS* (Martens *et al.*, 2007) e muitos deles apresentam atividade antimicrobiana (Bruhn *et al.*, 2007). Os membros do grupo *Roseobacter*, ordem *Rhodobacterales*, são encontrados não só em ambientes marinhos, tais como sedimentos de água do mar, mas também em organismos marinhos (Kurahashi & Yokota, 2007). O gênero *Phaeobacter* foi criado (Martens *et al.*, 2006) para classificar uma espécie nova, *Phaeobacter inhibens*, juntamente com a espécie *Phaeobacter gallaeciensis*, previamente classificada no gênero *Roseobacter*. A espécie *Phaeobacter inhibens* foi isolada do ambiente marinho e produz um antibiótico que exibe atividade inibitória contra várias algas e bactérias marinhas (Brinkhoff *et al.*, 2004, Martens *et al.*, 2007). Assim como ela, outras espécies do gênero foram descritas ou em associação com moluscos (Ruiz-Ponte *et al.*, 1998), ou recuperadas após uma maré alta do mar amarelo na Coreia (Yoon *et al.*, 2007), ou isoladas de sedimentos marinhos do oceano ártico (Zhang *et al.*, 2008). Um único isolado (B627) desse gênero foi recuperado da esponja *Chelonaplysilla erecta* no presente estudo.

Bactérias do gênero *Vibrio* são normalmente encontradas em ambientes aquáticos onde são muitas vezes associadas às superfícies, mas também podem ser encontradas como bactérias pelágicas ou em várias profundidades no mar (West & Colwell, 1984; Eilers *et al.*, 2000), podendo ser patogênicas a humanos e a peixes. O

gênero *Vibrio* já foi encontrado em associação com esponjas marinhas. Santavy e colaboradores (1990) constataram que aproximadamente 78% das bactérias cultiváveis associadas à esclerosponja *Ceratoporella nicholsoni* eram espécies das famílias de *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*. Outros estudos também relatam a presença de gênero *Vibrio* em associação com esponjas marinhas (Sfanos *et al.*, 2005). Hentschel e colaboradores (2001) acreditam que o isolado *Vibrio* sp. SB177, recuperado em seus estudos, seja um habitante comum do mesófilo das esponjas, visto que os víbrios estão frequentemente associados a este organismo marinho, entretanto, seu papel ecológico ainda não está totalmente esclarecido. No presente estudo, representantes do gênero *Vibrio* foram recuperados das esponjas *Drummacidon reticulata* e *Chelonaplysilla erecta*, em concordância com os relatos da literatura.

Dois isolados, um (B733) da esponja *Petromica citrina* e outro (B718) da esponja *Drummacidon reticulata*, mostraram relação filogenética com a ordem *Alteromonadales*, gêneros *Aestuariibacter* e *Pseudoalteromonas*, respectivamente. Estes dois gêneros já foram descritos na literatura em associação com invertebrados marinhos, incluindo esponjas marinhas (Sfanos *et al.*, 2005). Esses gêneros são habitantes amplamente difundidos no ambiente marinho e têm sido isolados de diversas fontes marinhas (Yi *et al.*, 2004). O gênero *Aestuariibacter*, e outros membros da classe *Gammaproteobacteria*, podem representar um grupo de bactérias oportunistas e generalistas com especificidade limitada para um determinado hospedeiro. Vários dos representantes dessa classe apresentam, no entanto, interessantes capacidades fisiológicas que podem beneficiar seus hospedeiros, dentre elas, pode-se citar o metabolismo do enxofre (Hill *et al.*, 2006).

Um isolado (B729) pertencente ao gênero *Mycobacterium*, o único representante do filo *Actinobacteria*, foi recuperado da esponja *Axinella corrugata* no presente estudo.

Este filo é considerado um importante grupo de bactérias com valor considerável como prolíficos produtores de antibióticos e outros compostos terapêuticos (Zhang *et al.*, 2006). Embora esteja se tornando evidente que os *habitats* marinhos são uma fonte abundante de *Actinobacteria*, pouco se sabe sobre a diversidade deste grupo em amostras marinhas quando comparados à diversidade de *Actinobacteria* isoladas de ambientes terrestres (Fenical & Jensen, 2006, Zhang *et al.*, 2006, Hughes & Fenical, 2010).

Três isolados apresentaram estreita relação filogenética com os membros do filo *Bacteroidetes*, que estão presentes em grande número em ambientes marinhos, onde realizam diferentes funções de importância ecológica (Khan *et al.*, 2007). Seus possíveis papéis no ciclo do carbono, na degradação de matéria orgânica particulada e dissolvida e na atividade contra algas têm sido discutidos (Khan *et al.*, 2007). A família *Flavobacteriaceae*, um dos principais ramos do filo *Bacteroidetes*, abrange os isolados filiados a *Galbibacter* (B619) e *Aquimarina* (B570), ambos recuperados neste estudo. Recentemente, novos membros da família *Flavobacteriaceae* têm sido isolados de diferentes ambientes marinhos (Liu *et al.*, 2006;. Khan *et al.*, 2007).

A abundância de membros marinhos em *Flavobacteriaceae* sugere que essa família desempenhe um papel importante nos ecossistemas marinhos e nos ciclos biogeoquímicos, em interação com outros organismos marinhos (Liu *et al.*, 2006).

No presente estudo, a família *Cyclobacteriaceae* foi representada por um isolado (B615) filiado à espécie *Cyclobacterium marinum*. O gênero se caracteriza por apresentar células Gram-negativas, estritamente aeróbicas, heterotróficas, imóveis e com coloração rosa (Nedashkovskaya *et al.*, 2005). Além disso, linhagens desse gênero podem formar células em formato de anel (Nedashkovskaya *et al.*, 2005) ou de ferradura, sendo constituintes comuns dos ecossistemas marinhos (Ying *et al.*, 2006). A família também parece estar envolvida nos ciclos biogeoquímicos em ambientes

aquáticos (Bowman *et al.*, 2003). Espécies do gênero já foram isoladas de água do mar (Nedashkovskaya *et al.*, 2005) e sedimento de campo petrolífero (Ying *et al.*, 2006), entretanto, sua associação a invertebrados marinhos ainda não foi relatada até o presente. Este é o primeiro trabalho científico que descreve o isolamento de um membro da espécie *Cyclobacterium marinum* associado a uma esponja marinha.

As esponjas *Dragamacidon reticulata* e *Axinella corrugata* parecem ter uma distribuição equilibrada dos gêneros encontrados, enquanto que na esponja *Petromica citrina* o gênero *Bacillus* apresentou clara predominância (74% dos isolados dessa esponja). Em *Chelonaplysilla erecta* os gêneros *Ruegeria* e *Pseudovibrio* foram recuperados em maior número quando comparado aos demais grupos.

## **6.2. AVALIAÇÃO GENÉTICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS**

As enzimas multifuncionais *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* de bactérias, fungos e plantas são responsáveis pela produção de uma grande e estruturalmente distinta família de produtos naturais bioativos, os quais incluem diversos antibióticos, toxinas, sideróforos e imunossupressores (Cane *et al.*, 1998; Crosa & Walsh, 2002; Moffitt & Neilan, 2003; Hill, 2003; Hill, 2004; Hill, 2005). Estes policetídeos vêm sendo isolados de esponjas e de outros invertebrados marinhos (Okada *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004), mas a investigação dos genes que codificam as PKSs e NRPSs de micro-organismos marinhos é ainda incipiente (Zhang *et al.*, 2009; Abdelmohsen *et al.*, 2010).

Em bactérias, a biossíntese de policetídeos, como macrolídeos, polienos ou poliéteres, requer o sistema *PKS* tipo I, que é de especial interesse por sua modularidade e aptidão para a criação de policetídeos personalizados (Salomon *et al.*, 2004). As *PKSs* bacterianas tipo II consistem em um complexo heterólogo ou homólogo multi-enzimático que geralmente é responsável pela produção de

policetídeos aromáticos (Salomon *et al.*, 2004). Da mesma forma, as *NRPSs* são grandes complexos multifuncionais que constroem cadeias a partir de blocos de construção selecionados individualmente. As *NRPSs* também são organizadas em módulos, cada um dos quais é responsável por um ciclo de alongamento através da incorporação de um único aminoácido à cadeia peptídica crescente. Portanto, a estratégia de triagem para *PKSs* e *NRPSs*, utilizada neste estudo, pode ser usada para ajudar a investigar a diversidade de produtos naturais de bactérias, a qual muitas vezes reflete a diversidade genética bacteriana (Salomon *et al.*, 2004).

No presente estudo, bactérias isoladas pertencentes a 11 gêneros diferentes demonstraram presença de pelo menos um dos fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*. Bactérias de três gêneros foram positivas para os três genes (*Mycobacterium*, *Ruegeria* e *Pseudovibrio*), bactérias de seis gêneros foram positivas para dois genes (*Exiguobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Ruegeria*, *Pseudovibrio*); e isolados de seis gêneros foram positivos para apenas um gene (*Paracoccus*, *Erythrobacter*, *Galbibacter*, *Cyclobacterium*, *Bacillus*, *Vibrio*).

Alguns isolados compartilhando padrão *ARDRA* idênticos diferiram entre si nas combinações "*PKS I-PKS II-NRPS*". A linhagem CBMAI 1220, identificada como *Pseudovibrio denitrificans*, é um exemplo claro de diferentes combinações de presença ou ausência dos fragmentos dos genes mesmo em isolados considerados semelhantes. Algumas cepas de *Bacillus* e *Ruegeria* também mostraram o mesmo padrão (Tabela 3). Jiang e colaboradores (2007) também encontraram actinobactérias associadas a uma esponja marinha que apresentaram diferentes combinações "*PKS-I-PKS-II-NRPS*" dentro da mesma espécie.

Kennedy e colaboradores (2009) analisaram a presença de genes *PKS* e *NRPS* em bactérias isoladas da esponja marinha *Haliclona simulans* coletada em águas irlandesas. Os resultados mostram que estes genes estavam presentes na maioria dos

filos de bactérias, mas prevaleceram entre representantes dos filos *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Essa descoberta sugere um possível papel na produção de metabólitos bioativos para esses grupos (Kennedy *et al.*, 2009). Embora as actinobactérias terrestres sejam produtoras notáveis de um grande número de antibióticos, os representantes marinhos são, ainda, muito pouco estudados neste contexto (Abdelmohsen *et al.*, 2010). O *Mycobacterium* (B729) isolado no presente estudo demonstrou presença concomitante dos fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*.

O trabalho de Kennedy e colaboradores (2010) foi o primeiro a relatar a presença de genes *PKS* e *NRPS* em linhagens do gênero *Pseudovibrio*. Análises genômicas de *Alfaproteobacteria* detectaram níveis relativamente baixos de genes relacionados a metabólitos secundários nessas bactérias, e apenas 10 em 23 genomas analisados apresentaram os genes *PKS* ou *NRPS* (Donadio *et al.*, 2007). Estudos já detectaram atividade antimicrobiana instável em *Pseudovibrios* (Kennedy *et al.*, 2009, Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008), possivelmente sugerindo uma origem extracromossômica para essa atividade antimicrobiana (Kennedy *et al.*, 2009). Curiosamente, plasmídeos grandes foram encontrados em *Pseudovibrios* isolados de larvas de esponjas (Enticknap *et al.*, 2006), corroborando essa hipótese. No presente trabalho, representantes da espécie *Pseudovibrio denitrificans* também demonstraram a presença dos fragmentos dos genes *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* em diferentes combinações.

Trabalhos envolvendo análises de genomas inteiros revelaram que as bactérias do gênero *Bacillus* podem dedicar mais de 3% do seu genoma a genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários, como policetídeo sintases e peptídeo sintases não ribossomais (Donadio *et al.*, 2007). Os fragmentos dos genes *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* estiveram presentes em isolados de *Bacillus* caracterizados nesse estudo.

Além do gênero *Bacillus*, o gênero *Staphylococcus*, pertencente ao filo *Firmicutes*, tem relatos descritos na literatura demonstrando a presença de genes *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* em bactérias deste táxon isoladas de esponjas marinhas (Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b). Em nosso estudo foi confirmada a presença de apenas um gene, o *PKS II*, em três isolados pertencentes a este gênero.

Existem poucos estudos envolvendo a busca de genes *PKS* e *NRPS* em bactérias. A maioria deles revela apenas a presença destes genes no filo *Actinobacteria* (Gontang *et al.*, 2010, Jiang *et al.*, 2008, Uduary *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2007). Nossos resultados revelam a presença de pelo menos um dos genes do sistema *PKS* e *NRPS* nos isolados representantes dos gêneros *Mycobacterium*, *Ruegeria*, *Exiguobacterium*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Paracoccus*, *Erythrobacter*, *Galbibacter* e *Cyclobacterium* (Tabela 3), o que destaca a importância do presente estudo. Ainda, considerando o fato de que esses genes regulam a biossíntese de metabólitos secundários e que muitas vezes apresentam uma série de atividades biológicas, nossos resultados expandem a ocorrência de bactérias que podem produzir novos compostos.

No presente trabalho a atividade antimicrobiana preliminar foi verificada em isolados dos gêneros *Bacillus* e *Exiguobacterium*, representantes do filo *Firmicutes*; bem como em isolados dos gêneros *Vibrio* e *Pseudovibrio*, representantes do filo *Proteobacteria* (Tabela 4). Curiosamente, o único representante encontrado do filo *Actinobacteria*, o isolado (B729), não demonstrou atividade contra nenhuma das linhagens indicadoras testadas, mesmo apresentando resultado positivo para presença dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*. Este resultado contradiz os dados de literatura que evidenciam o potencial para a atividade antimicrobiana das actinobactérias. Entretanto, um estudo conduzido por Long & Azam (2001) mostram que isolados pertencentes ao

filo *Actinobacteria*, surpreendentemente, também não demonstraram atividade antibacteriana (Long & Azam, 2001).

Dados de literatura relatam a produção de compostos bioativos por representantes do gênero *Pseudovibrio* (Sertan-de Guzman *et al.*, 2007, Kennedy *et al.*, 2009, Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008). Um exemplo é um pigmento vermelho com propriedades antibacterianas e antimaláricas produzido por linhagens de *Pseudovibrio* (Sertan-de Guzman *et al.*, 2007). A atividade antibiótica de linhagens de *Pseudovibrio* do estudo de Sertan-de Guzman e colaboradores (2007) não foi detectada em cepas cultivadas em meio líquido.

Em um estudo sobre a atividade antimicrobiana de bactérias marinhas associadas a esponjas da Índia, Muscholl-Silberhorn e colaboradores (2008) mostraram que uma única *Alfaproteobacteria*, que foi relacionada à espécie *Pseudovibrio denitrificans*, dominou a cultura das comunidades de pelo menos seis das esponjas. No entanto, ela exibiu uma atividade antimicrobiana fraca e instável, que foi facilmente perdida durante o cultivo.

Santos e colaboradores (2010), em estudo recente, encontraram cepas ativas de um *Pseudovibrio* que demonstraram alta taxa de inibição (50%) das indicadoras testadas. Nesse caso, os isolados apresentaram atividade antimicrobiana estável, mesmo após três sucessivas passagens em meio de cultura (Santos *et al.*, 2010), diferentemente do que ocorreu no presente estudo, já que a atividade em *Pseudovibrio* foi apenas detectada na triagem inicial. Isso pode ter ocorrido devido a possível instabilidade do composto com atividade inicialmente detectado no ensaio de difusão em bloco de ágar, conforme já reportado na literatura (Sertan-de Guzman *et al.*, 2007, Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008).

Dos gêneros que possuíram atividade na triagem inicial, apenas o gênero *Pseudovibrio* não apresentou nenhum isolado com atividade antimicrobiana nos

ensaios para determinação da CIM. Assim, representantes dos gêneros *Bacillus*, *Exiguobacterium* e *Vibrio* demonstraram atividade antimicrobiana nos ensaios para determinação da CIM (Tabela 5 e 6).

Os *Bacillus* terrestres são amplamente reconhecidos como uma rica fonte de agentes antimicrobianos (Gebhardt *et al.*, 2002). Muitos antibióticos incluindo peptídeos cíclicos, lipopeptídeos cíclicos e novos tiopeptídeos foram reportados de *Bacillus* sp. marinhos (Nagai *et al.*, 2003).

Santos e colaboradores (2010) isolaram, a partir de esponjas marinhas, cepas ativas (Pc31, PC32, Dr31 e H42) pertencentes ao gênero *Bacillus*. Os *Bacillus pumilus* Pc31 e PC32 inibiram o crescimento de 60% das cepas indicadoras. No estudo de Kennedy e colaboradores (2009), um *Bacillus* foi capaz de produzir substâncias ativas contra bactérias patogênicas resistentes a drogas.

No presente estudo, dois representantes do gênero *Bacillus*, B593 e B616, demonstraram atividade moderada e alta, respectivamente, frente ao micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Além disso, outros *Bacillus* demonstraram atividade contra essa mesma bactéria indicadora. Assim, a alta inibição de linhagens de *Bacillus* por outros *Bacillus* sugere que a atividade pode estar relacionada a produção de bacteriocinas, que são polipeptídeos produzidos pela via ribossomal e inibem o crescimento de grupos próximos de micro-organismos (Vacelet & Donadey, 1977). Sua possível função no meio ambiente é prover vantagem seletiva através da eliminação de um competidor relativamente próximo. Neste sentido, a ecologia microbiana do mesófilo das esponjas, com relação ao número elevado de bactérias taxonomicamente diversas, fornece um ambiente que seria favorável para a produção das bacteriocinas (Hentschel *et al.*, 2001). O isolado B616, identificado como *Bacillus* sp., também demonstrou alta inibição frente o micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 11775, tendo também sido detectada a atividade bactericida. Essa foi uma inibição pouco comum, já

que as bactérias Gram-negativas geralmente são menos suscetíveis aos antimicrobianos de bactérias Gram-positivas devido à presença de uma membrana externa e lipopolissacarídeo (LPS), que juntos atuam como uma barreira eficaz contra moléculas hidrofóbicas e lipofílicas (Snyder & McIntosh, 2000).

O isolado pertencente ao gênero *Exiguobacterium*, o qual demonstrou atividade contra o *Bacillus subtilis* ATCC 6051, é o primeiro relato da literatura de um isolado deste gênero com esse tipo de atividade. Nesse caso, foi detectada apenas uma atividade bacteriostática, uma vez que em nenhuma concentração testada o extrato foi capaz de matar 99,9% das bactérias indicadora.

No ambiente marinho o gênero *Vibrio* já foi relatado em biofilmes de superfícies, em bactérias pelágicas e em associação com invertebrados (West & Colwell, 1984). Thiel e Imhoff (2003) relataram a presença do gênero *Vibrio* em seu estudo sobre identificação filogenética de bactérias produtoras de antibióticos de esponjas do Mediterrâneo. Espécies de *Vibrio* tem sido uma fonte rica de novos metabólitos bacterianos biologicamente ativos. Compostos bioativos já foram relatados em vibrios marinhos, incluindo derivados isolados de esponjas marinhas (Anand *et al.*, 2006). O isolado B515, identificado como *Vibrio* sp., foi única bactéria Gram negativa que demonstrou atividade antimicrobiana no presente trabalho. Sua inibição foi considerada moderada na CIM (1 mg/mL) e demonstrou atividade bactericida, embora numa concentração maior de extrato (2 mg/mL).

O presente estudo abre caminho para a descoberta de novos compostos bioativos produzidos por bactérias associadas às esponjas marinhas. Resultados promissores para atividade antimicrobiana de pelo menos 13 extratos de bactérias foram obtidos e novos experimentos serão conduzidos num esforço efetivo para separação e investigação do princípio ativo e elucidação da conformação final das moléculas.

## 7. CONCLUSÕES

- As bactérias isoladas de esponjas marinhas coletadas no litoral norte do Estado de São Paulo caracterizadas nesse estudo foram relacionadas aos filos: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, corroborando os relatos da literatura;
- A técnica do *ARDRA*, utilizada nesse estudo para agrupar isolados semelhantes foi eficiente, embora não tenha sido capaz de agrupar todos os isolados semelhantes, já que outros foram agrupados utilizando a matriz de distância evolutiva obtida pelo programa MEGA versão 4.0;
- Este foi o primeiro estudo sobre diversidade de bactérias cultiváveis da esponja *Petromica citrina*, espécie endêmica do litoral brasileiro, cujos isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rugeria*, *Erithrobacter*, *Pseudovibrio* e *Vibrio*;
- A maioria das linhagens de *Bacillus* sp. com atividade antimicrobiana foi isolada da esponja *Petromica citrina*, endêmica do litoral brasileiro;
- Representantes do gênero *Pseudovibrio* foram recuperados de todas as esponjas marinhas utilizadas neste estudo;
- Foi verificada a presença da espécie *Cyclobacterium marinum* associada a uma esponja marinha, sendo este o primeiro relato dessa associação na literatura;
- A amplificação dos fragmentos dos genes *PKS* -I, *PKS*-II e *NRPS* sugeriu que alguns isolados bacterianos possuam potencial biotecnológico para a produção de compostos com bioatividades e expandiu a ocorrência dos grupos que possam produzir tais compostos;
- Foi detectada a atividade antimicrobiana promissora em pelo menos 13 isolados de bactérias associadas às esponjas marinhas;

- Um representante do gênero *Exiguobacterium* apresentou atividade antimicrobiana, sendo este o primeiro relato na literatura dessa atividade;
- Não houve correlação entre a presença ou ausência dos fragmentos dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* e a atividade antimicrobiana analisada através do método de difusão em bloco de Ágar e determinação da CIM no presente trabalho, sugerindo que as atividades antimicrobianas detectadas não sejam metabólitos provenientes das vias *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmohsen, U. R., Pimentel-Elardo, S. M., Hanora, A., Radwan, M., Abou-El-Ela, S. H. Ahmed, S. Hentschel, U. (2010) Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Mar Drugs.*, 8(3):399–412.
- Aligianis N., Kalpoutzakis, E., Mitaku S., Chinou I. B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49:4168-4170.
- Althoff, K., Schutt, C., Steffen, R., Batel, R., Muller, W. E. G. (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria. *Mar. Biol.*, 130:529–536.
- Anand, T. P.; Bhat, A. W.; Shouche, Y. S.; Roy, U; Siddharth, J.; Sarma, S. P. (2006) Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161:252-262.
- Austin, M. B., Noel, A. J. P. (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, 20:79–110.
- Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O. (2005) New PCR *primers* for the *screening* of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49(1):10-24.
- Bavestrello, G., Arillo, A., Calcinai, B., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C., Gaino, E., Penna, A., Sara, M. (2000) Parasitic diatoms inside Antarctic sponges. *Biol. Bull.*, 198:29–33.
- Bérdy, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *J. Antibiot.* 58(1):1–26.
- Bergmann, W., Burke, D.C. (1955) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *J. Org. Chem.*, 20:1501–1507.
- Bernan, V.S.; Greenstein, M.; Maise, W.M. (1997) Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.*, 43:57–89.
- Bewley, C. A., Holland, N. D., Faulkner, D. J. (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52:716–722.
- Blunt, J. W., Copp, B. R, Munro, M. H., Northcote, P. T., e Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22:15–61.
- Bowman, J. P., Nichols, C. M., Gibson, J. A. E. (2003). *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov. and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1343–1355.

- Brinkhoff, T., Bach, G., Heidorn, T., Liang, L., Schlingloff, A., Simon, M. (2004). Antibiotic production by a Roseobacter clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl Environ Microbiol*, 70:2560–2565.
- Bruhn, J.B., Gram, L., Belas, R. (2007) Production of antibacterial compounds and biofilm formation by Roseobacter species are influenced by culture conditions. *Appl Environ Microbiol*, 73:442-450.
- Burja, A. M., Hill, R. T. (2001) Microbial symbionts of the Australian Great Barrier Reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia*, 461:41–47.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., Khosla, C. (1998) Harnessing the Biosynthetic Code: combinations, Permutations, and Mutations. *Science*, 282(5386):63-8.
- Cedro, V. R., Hajdu, E., Sovierzosky, H. H., Correia, M. D. (2007) Demospongiae (Porifera) of the shallow coral reefs of Maceió, Alagoas State, Brazil. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. 233-237.
- Cerrano, C., A. Arillo, G. Bavestrello, B. Calcinai, R. Cattaneo-Vietti, A. Penna, M. Sara, C. Totti. (2000) Diatom invasion in the Antarctic hexactinellid sponge *Scolymastra joubini*. *Polar Biol.*, 23:441–444.
- Cerrano, C., Calcinai, B., Cucchiari, E., Camillo, C. D., Totti, C., Bavestrello, G. (2004) The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae). *Polar Biol.*, 27:231–237.
- Chaturvedi, P., Prabakar, V., Manorama, R., Pindi, P. K., Bhadra, B., Begum, Z., Shivaji, S. (2008) *Exiguobacterium soli* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58:2447–2453.
- Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R., Riccardi, G.. (2004) Characterization and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 309:21–33.
- Christiansen, G., Dittmann, E., Ordorika, L. V., Rippka, R., Herdman, M., Borner, T. (2001) Nonribosomal peptide synthase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Arch Microbiol*, 176:452–458.
- CLSI 2002. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Method M27-A2, 2<sup>nd</sup> ed. Wayne Ed.; Vol. 22 (15), pp 1-29.
- CLSI 2003. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA.

- Collins, M. D., Lund, B. M., Farrow, J. A. E., Schleifer, K. H. (1983). Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2037–2042.
- Crosa, J. H., Walsh, C. T. (2002) Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2): 223-249.
- Davis, D. H., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., Mandel, M. (1969). Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int J Syst Bacteriol*, 19:375–390.
- Denner, E. B. M., Vybiral, D., Koblizek, M., Kampfer, P., Busse, H. J., Velimirov, B. (2002). *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellow pigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll a, isolated from the western Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1655–1661.
- Devasahayam, G., Scheld, W. M., Hoffman, P. S. (2010) Newer antibacterial drugs for a new century. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(2):215-234.
- Dharmaraj, S., Ashokkumar, B., Dhevendaran, K. (2010) Isolation of marine *Streptomyces* and the evaluation of its bioactive potential. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (4):240-24.
- Dice, L.R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26:297–302.
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U., Dohren, H. V. (2005) Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:539–548.
- Donadio, S., Monciardini, P., Sosio, M. (2007) Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep*, 24:1073–109.
- Doshida, J., Hasegawa, H., Onuki, H., Shimidzu, N. (1996) Exophilin A, a new *antibiotic* from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. *J. Antibiot.*, 49:1105-1109.
- Egan, S., Thomas, T., Kjelleberg, S. (2008) Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 11:219–225.
- Eilers, H., Penthaler, J., Glockner, F. O., Amann, R. (2000) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3044-3051.
- Elyakov, G. B., Kuznetsova, T., Mikhailov, V. V., Maltsev, I. I., Bionov, V. G., Fedoreyev, S.A. (1991) Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia*, 47:632-633.

- Enticknap, J. J., Kelly, M., Peraud, O., Hill, R. T.. (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3724–3732.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P: (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.
- Ewing, B., Green, P: (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8:186-194.
- Faulkner, D. J., Harper, M. K., Haygood, M. G., Salomon, C. E., Schmidt, E. W. (2000) In: Fusetani, N (Ed.) Symbiotic Bacteria in Sponges: Sources of Bioactive Substances. *Drugs from the Sea*, Karger, Basel, pp 107–119.
- Fenical, W., Jensen, P. R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, (2): 666 – 673.
- Fieseler, L., Hentschel, U., Grozdanov, L., Schirmer, A., Wen, G., Platzer, M., Hrvatin, S., Butzke, D., Zimmermann, K., Piel, J. (2007) Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol*, 73:2144–2155.
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., Hentschel, U. (2004) Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol*, 70:3724–3732.
- Friedrich, A. B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., Hentschel, U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.*, 134:461-470.
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., Harayama, S. (2006) *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:343-347.
- Fusetani, N. (2004) Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 94–104.
- Fusetani, N., Matsunaga, S. (1993) Bioactive sponge peptides. *Chem. Rev.*, 93: 1793–1806.
- Gaino, E., Rebora, M. (2003) Ability of mobile cells of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* (Porifera, Demospongiae) to digest diatoms. *Ital. J. Zool.*, 70: 17–22.
- Gaino, E., Sara, M. (1994) An ultrastructural comparative study of the eggs of 2 species of *Tethya* (Porifera, Demospongiae). *Invertebr. Reprod. Dev.*, 26: 99–106.
- Garson, M. J., Flowers, A. E., Webb, R. I., Charan, R. D., McCaffrey, E. J. (1998) A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient centrifugation. *Cell Tissue Res.*, 293:365–373.

- Gebhardt, K., Schimana, J., Müller, J., Fiedler, H-P., Kallenborn, H. G., Holzenkämpfer, M., Krastel, P., Zeeck, A., Vater, J., Höltzel, A., Schmid, D. G., Rheinheimer, J., Dettner, K. (2002) Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2):199–205.
- Gokhale R. S., Tsuji S. Y., Cane, D. E., Khosla C. (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science*, 284:482-485.
- Gontang, E. A., Gaudêncio, S. P., Fenical, W., Jensen, P. R. (2010) Sequence-Based Analysis of Secondary Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 76(8): 2487–2499.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P: (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8:195-202.
- Gordon, D. (2004) "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley , Co., 11.2.1-11.2.43.
- Gunasekera, A. S., Sfanos, K. S., Harmody, D. K., Pomponi, S. A., McCarthy, P. J., Lopez, J. V. (2004) An enhanced database of the microorganisms associated with deeper water marine invertebrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 373–376.
- Haefner, B. (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8:536-544.
- Hajdu, E., Berlinck, R. G. S., Freitas, J. C. (1999) Porifera. In: Migotto A, Tiago CG (eds). *Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX* (ser. eds. Joly CA, Bicudo CEM), vol. 3. Invertebrados Marinhos. Fapesp, São Paulo. pp. 20-30.
- Haleblian, S., Harris, B., Finegold, S. M., Rolfe, R. D. (1981) Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 3 (3): 444-448.
- Hardoim, C. C. P., Costa, R., Araujo, F. V., Hajdu, E., Peixoto, R., Lins, U., Rosado, A. S., Van Elsas, J. D. (2009) Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (10):3331–3343.
- Haygood, M. G., Schmidt, E. W., Davidson, S. K., Faulkner, D. J. (1999) Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*, 1: 33–43.

- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B. S. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4431–4440.
- Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., Hacker, J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35:305–312.
- Hentschel, U., Usher, K. M., Taylor, M. W. (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 55:167–177.
- Hill, M., Wilcox, T. (1998) Unusual mode of symbiont repopulation after bleaching in *Anthosigmella varians*: acquisition of different zooxanthellae strains. *Symbiosis*, 25:279–289.
- Hill, M., Hill, A., Lopez, N., Harriott, O. (2006) Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Marine Biology* 148 (6): 1221-1230.
- Hill, R.A. (2003) Marine natural products. *Annu Rep Prog Chem*, 99:183–207.
- Hill, R.A. (2004) Marine natural products. *Annu Rep Prog Chem*, 100:169–189.
- Hill, R.A. (2005) Marine natural products. *Annu Rep Prog Chem*, 101:124–136.
- Holmes, B., Blanch, H. (2006) Genus-specific associations of marine sponges with group I crenarchaeotes. *Mar. Biol.*, 150:759–772.
- Huang, X. H., Van Soest, R., Roberge, M., Andersen, R. J. (2004) Spiculoic acids A and B, new polyketides isolated from the Caribbean marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. *Org Lett*, 6:75–78.
- Hughes, C. C., Fenical, W. (2010) Antibacterials from the Sea. *Chemistry - A European Journal*, 16(42): 12512–12525.
- Hunter-Cevera, J. C., Belt, A. (1996) *Maintenance Cultures for Biotechnology*, Industry. London, Academic Press. 263pp.
- Ichikawa, T., Ishikura, T., Ozaki, A. (1971) Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica*, 16: 218-224.
- Imhoff, J.F. , Stohr, R. (2003) Sponge-associated bacteria: general overview , special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. *Prog Mol Subcell Biol.* 37: 35–57.
- Isnansetyo, A. , Kamei, Y. (2003) MC21-A, a Bactericidal Antibiotic Produced by a New Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30<sup>T</sup>, against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2):480-488.

- Ivanova, E. P., Bowman, J. P., Lysenko, A. M., Zhukova, N. V., Gorshkova, N. M., Kuznetsova, T. A., Kalinovskaya, N. I., Shevchenkob, L. S., Mikhailov, V. V. (2005) *Erythrobacter vulgaris* sp. nov., a novel organism isolated from the marine invertebrates. *Systematic and Applied Microbiology*, 28:123–130.
- Jensen, P. R., Fenical, W. (1994) Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48: 559–584.
- Jiang, S., Li, X., Zhang, L., Sun, W., Dai, S., Xie, L., Liu, W., Lee, K. J. (2008) Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Mar Biol* 153:945–952.
- Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J., Li, X. (2007) Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92:405–416.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman J. L., Daszak, P. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451: 990–993.
- Kelly, D. P., Euzéby, J. P., Goodhew, C. F., Wood, A. P. (2006a). Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56: 2495 - 2500.
- Kelly, D. P., Rainey, F. A., Wood, A. P. (2006b). The genus *Paracoccus*. *The Prokaryotes*. 5: 232–249.
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., Bourke, M. B., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J. R., Dobson, A. D. W. (2009) Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Mar Biotechnol*, 11:384–396.
- Keyzers, R. A., Davies-Coleman, M. T. (2005) Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. *Chem. Soc. Rev.*, 34: 355–365.
- Khan, S. T., Nakagawa, Y., Harayama, S. (2007) *Galbibacter mesophilus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:969–973.
- Kim, T. K., Fuerst, J. A. (2006) Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ. Microbiol.*, 8:1460–1470.
- Kim, T. K., Garson, M. J., Fuerst, J. A. (2005) Marine actinomycetes related to the “*Salinospora*” group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.* 7:509–518.

- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kirsop, B. E., Doyle, A. (1991) Maintenance of Microorganisms , Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods. 2nd ed., London, Academic Press. 308pp.
- Klautau, M., Russo, C. A. M., Lazoski, C., Boury-Esnault, N., Thorpe, J., Solé-Cava, A (1999) Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution*, 53:1414-1422
- Kobayashi, J. , Ishibashi, M. (1993) Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms *Chem. Rev.*, 93 (5): 1753–1769.
- Kurahashi, M., Yokota, A. (2007) *Tateyamaria omphalii* gen. nov., sp. nov., an  $\alpha$ -Proteobacterium isolated from a top shell *Omphalius pfeifferi pfeifferi*. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 371–375.
- Lafi, F. F., Garson, M. J., Fuerst, J. A. (2005) Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the Great Barrier Reef display similar phylogenetic diversity. *Microb. Ecol.*, 50:213–220.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82:6955-6959.
- Larkum, A. W. D., Cox, G. C., Hiller, R. G., Parry, D. L., Dibbayawan, T. P. (1987) Filamentous cyanophytes containing phycourobilin and in symbiosis with sponges and an ascidian of coral reefs. *Mar. Biol.*, 95: 1-13.
- Lazoski, C., Solé-Cava, A. M., Boury-Esnault, N., Klautau, M., Russo, C. A. M. (2001) Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Mar Biol*, 139: 421-429
- Lee, E. Y., Lee, H. K., Lee, Y. K., Sim, C. J., Lee., J. H. (2003) Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomol. Eng*, 20: 299–304.
- Lee, O. O., Lau, S. C., Tsoi, M. M., Li, X., Plakhotnikova, I., Dobretsov, S., Wu, M. C., Wong, P. K., Qian, P. Y. (2006) *Gillisia myxillae* sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the marine sponge *Myxilla incrustans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:1795–1799.
- Lee, Y. K., Lee, J-H., Lee, H. K. Microbial Symbiosis in Marine Sponges (2001) *The Journal of Microbiology*, 39(4): 254-264.

- Li, Z. Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical Metabolites. (2009) *Mar. Drugs*, 7: 113-129.
- Liu, Z.-P., Wang, B.-J., Dai, X., Liu, X.-Y., Liu, S.-J. (2006) *Zhouia amylytica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from sediment of the South China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2825–2829.
- Lo Giudice, A., Brilli, M., Bruni, V., Domenico, M. D., Fani, R., Michaud, L. (2007) Bacterium bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (TerraNovaBay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol*, 60:383–396.
- Long, R. A., Azam, F. (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 67(11): 4975-4983.
- Margot, H., Acebal, C., Toril, E., Amils, R., Fernandez Puentes, J. L. (2002) Consistent association of crenarchaeal archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.*, 140:739–745.
- Marinho, P. R., Muricy, G. R. S., Silva, M. F. L., deMarval, M. G., Laport, M. S. (2010) Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(2): 267-275.
- Martens, T., Gram, L., Grossart, H. P., Kessler, D., Müller, R., Simon, M., Wenzel, S. C., Brinkhoff, T. (2007). Bacteria of the Roseobacter clade show potential for secondary metabolite production. *Microb Ecol*, 54: 31–42.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B. J. , Brinkhoff, T. (2006). Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 1293–1304.
- Matsunaga, S, Fusetani, N. (2003) Nonribosomal peptides from marine sponges. *Curr. Org. Chem.*, 7: 945–966.
- Matsuura, T. (2004) Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C., Fu, H., Betlach, M., Ashley, G. (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “unnatural” natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:1846-1851.

- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto P. B., Passarini, M. R.Z., Silva, C. H. D., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garborggini, F., Oliveira, V. M., Berlinck, R. G. S., Sette, L. D. (2010) Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*, 165:466-482.
- Metsa-Ketela, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. (1999) An efficient approach for *screening* minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 180:1-6.
- Moffitt, M. C., Neilan, B. A. (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol*, 56:446–457.
- Montalvo, N. F., Mohamed, N. M., Enticknap, J. J., Hill, R. T. (2005) Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 29–36.
- Moore, B. S. (2006) Biosynthesis of marine natural products: macroorganisms, part B. *Nat. Prod. Rep.*, 23:615–629.
- Moraes, F. C., Vilanova, E. P., Muricy, G. (2003) Distribuição das esponjas (Porífera) na reserva biológica de Atol das Rocas, Nordeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional*, 61(1): 13-22.
- Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K-I, Nakagawa, Y. (2007) *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the Alphaproteobacteria isolated in Japan and Palau. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1304–1309.
- Muricy, G., Hajdu, E. (2006) Porifera Brasilis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Série Livros 17, Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Muricy, G., Ribeiro, S. (1999). Shallow-water Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) from Rio de Janeiro state, Brazil (Southwestern Atlantic). *Beaufortia*, 49(9):83-108.
- Muricy, G., Silva, O. C. (1999) Esponjas marinhas do Estado do Rio de Janeiro: um recurso renovável inexplorado. In: Silva SHG, Lavrado HP (eds). *Ecologia dos Ambientes Costeiros do Estado do Rio de Janeiro. Sér Oecol Bras*, vol. 2. PPGE-UFRJ. pp. 155-178.
- Muricy, G., Moraes, F. C. (1998). Marine sponges of Pernambuco State, NE Brazil. *Rev. bras. oceanogr.* 46(2): 213-217.
- Muricy, G., Esteves, E. L., Moraes, F. C., Santos, J. P., Silva, S. M., Klautau, M., Lanna, E. (2008) *Biodiversidade marinha da Bacia Potiguar: Porifera*. Série Livros 29. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 156
- Muricy, G., Hajdu, E., Custódio, M. R., Klautau, M., Russo, C., Peixinho, S. (1991) Sponge distribution at Arraial do Cabo, SE. Brazil. In: Magoon OT, Converse H, Tippie V, Tobie LT,

- Clark D (eds). *Proc 7th Symp Coast Ocean Manag (Long Beach, USA)*. ASCE Publ. 2:1183-1196.
- Muricy, G., Hajdu, E., Minervino, J. V., Madeira, A., V., Peixinho, S. (2001) Systematic revision of the genus *Petromica* Topsent (Demospongiae: Halichondrida), with a new species from the Southwestern Atlantic. *Hydrobiologia*, 443(1-3):103-128.
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V., Imhoff, J. F. (2008) Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55:94–106.
- Nagai, K., Kamigiri, K., Arao, N., Suzumura, K., Kawano, Y., Yamaoka, M., Zhang, H., Watanabe, M., Suzuki, K. (2003) YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from marine sponge. *J. Antibiotics*, 56 (2):123–128.
- Nedashkovskaya, O. L., Kim, S. B., Lee, M. S., Park, M. S., Lee, K. H., Lysenko, A. M., Oh, H. W., Mikhailov, V. V. , Bae, K. S. (2005). *Cyclobacterium amurskyense* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:2391–2394.
- Oclarit, J. M., Okada, H., Ohta, S., Kaminura, K., Yamaoka, Y., Iizuka, T., Miyashiro, S., Ikegami, S. (1994) Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios.*, 78:7-16.
- Okada, Y., Matsunaga, S., van Soest, R.W., Fusetani, N. (2002) Nagahamide A, an antibacterial depsipeptide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Org Lett*, 4:3039–3042.
- Olson, J. B., Harmody, D. K., McCarthy, P. J. (2002) Alpha-proteobacteria cultivated from marine sponges display branching rod morphology. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211: 169–173.
- Olson, J. B., Lord, C. C., McCarthy, P. J. (2000) Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples. *Microb. Ecol.*, 40: 139– 147.
- Osango, G. O., Muthike, E. W., Tsuma, L., Okoth, M. W., Bulimo, W. D., Lünsdorf, H., Abraham, W-R., Dion, M., Timmis, K. N, Golyshin, P. N., Mulaa, F. J. (2009) A salt lake extremophile, *Paracoccus bogoriensis* sp. nov., efficiently produces xanthophyll carotenoids. *African Journal of Microbiology Research* 3(8): 426-433.
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J. G., Hoffmann, F., Reitner, J., Schumann-Kindel, G. (2001) Sponge microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461: 55–62.
- Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, H. (1998) Cultivation of marine sponges for metabolite production: applications for biotechnology? *Trends Biotechnol.* 16: 130-134.

- Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., Franco, O. L. (2010) Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*, 24(5):1320-1334.
- Pabel, C. T., Vater, J., Wilde, C., Franke, P., Hofemeister, J., Adler, B., Bringmann, G., Hacker, J., Hentschel, U. (2003) Antimicrobial Activities and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of *Bacillus* Isolates from the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*. 5(5): 424-434.
- Pape, T., Hoffmann, F., Queric, N.-V., Juterzenka, K. v., Reitner, J., Michaelis, W. (2006) Dense populations of archaea associated with the demosponge *Tentorium semisuberites* Schmidt, 1870 from Arctic deep-waters. *Polar Biol.* 29: 662–667.
- Parada, M., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., Gutierrez, R., Buendia-Claveria, A. M., Lei, W., Margaret, I., Lopez-Baena, F.J., Gil-Serrano, A. M., Rodriguez-Carvajal, M. A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J. E. (2006) Sinorhizobium fredii HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19:43–52.
- Piel, J. (2004) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 519-538.
- Piel, J. (2006) Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.*, 13: 39–50.
- Pimentel-Elardo, S., Wehrl, M., Friedrich, A. B., Jensen, P. R., Hentschel, U. (2003) Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33:239–245.
- Pospiech, A., Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genetics*, 11(6): 217-218.
- Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F., DeLong, E. F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6241–6246.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. A., Wray, V., Steube, K. In *Marine Molecular Biotechnology* (ed. Müller, W. E. G.), Springer-Verlag, Berlin, 2003, pp. 117–142.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebel, R. (2002) Drugs from the seas—current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 125–134.
- Radjasa, O. K., Martens, T., Grossart, H., Brinkhoff, T., Sabdon, A., Simmon, M. (2007b) Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.*, 7:239–246.

- Radjasa, O. K., Sabdono, A., Junaidi, A., Zocchi, E. (2007a) Richness of secondary metabolite producing marine bacteria associated with sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Pharm.*, 3: 275–279.
- Rodrigues, D. F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. F., Tiedje, J. M. (2006) Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10:285–294.
- Roh, S. W., Nam, Y-D., Chang, H-W., Kim, K-H., Kim, M-S., Shin, K-S., Yoon, J-H., Oh, H-M., Bae, J-W. (2009) *Paracoccus aestuarii* sp. nov., isolated from tidal flat Sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:790–794
- Ruiz-Ponte, C., Cilia, V., Lambert, C., Nicolas, J. L. (1998). *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int J Syst Bacteriol* 48: 537–542.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.
- Salomon, C. E., Magarvey, N. A., Sherman, D. H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 21:105–121.
- Santavy, D. L., Willenz, P., Colwell, R. R. (1990) Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1750-1762.
- Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M. L, Santos, J. F. M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., Laport, M. S. (2010) Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, 161 (2010) 604-612.
- Scalera-Liaci, L., Sciscioli, M. Lepore, E., Gaino, E. (1999) Symbiotic zooxanthellae in *Cinachyra tarentina*, a non-boring demosponge. *Endocytobiosis Cell Res.*, 13:105–114.
- Scheuermayer, M., Gulder, T. A., Bringmann, G., Hentschel, U. (2006) *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum “*Verrucomicrobia*,” isolated from a sponge (*Porifera*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 2119–2124.
- Schwarzer, D. , Marahiel, M. A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88: 93–101.
- Sertan-de Guzman, A. A., Predicala, R. Z., Bernardo, E. B., Neilan, B. A., Elardo, S. P., Mangalidan, G. C., Tasdemir, D., Ireland, C. M., Barraquio, W. L., Concepcion, G. P. (2007) *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2):188–196.

- Sfanos, K., Harmody, D., Dang, P., Ledger, A., Pomponi, S., McCarthy, P., Lopez, J. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic , Applied Microbiology*, 28: 242–264.
- Shiba, T., Simidu, U. (1982) *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll a. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 211–217.
- Shieh, W. Y., Lin, Y-T., Jean, W. D. (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:2307–2312.
- Shigemori, H., Bae, M. A., Yazawa, K., Sasaki, T., Kobayashi, J. (1992) Alteramide A: a new tetracyclic alkaloid from bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.*, 57:4317-4320.
- Sigmund, J. M., Clark, D. J., Rainey, F. A., Anderson, A. S. (2003) Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases from natural populations of actinomycetes. *Microb Ecol*, 46:106–112.
- Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., Wijffels, R. H. (2005) Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotech Bioeng* 90, 201–221.
- Snyder, D. S., McIntosh, T. J. (2000) The Lipopolysaccharide Barrier: Correlation of Antibiotic Susceptibility with Antibiotic Permeability and Fluorescent Probe Binding Kinetics. *Biochemistry*, 39 (38).
- Staunton, J., Weissman, K. J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep.*, 18:380–416.
- Steindler, L., Huchon, D., Avni, A., Ilan, M. (2005) 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:4127–4131.
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H., Singleton, F. L. (1988) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44: 1021.
- Tamura, K., Dudley, J., Masatoshi, N., Sudhir Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2(8): 1596-1599.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71:295–347.

- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Nys, R., Kjelleberg, S., Steinberg, P. D. (2005). Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.*, 7:419–433.
- Thakur, A. N., Thakur, N. L., Indap, M. M., Pandit, R. A., Datar, V. V., Müller, W. E. G. (2005) Antiangiogenic, antimicrobial and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. *Mar. Biotechnol.*, 7, 245–252.
- Thakur, N.L., Müller, W.E.G. (2004) Biotechnological potential of marine sponges. *Curr. Sci.*, 86:1506–1512.
- Thiel, V., Imhoff, J. F. (2003) Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomol. Eng.*, 20:421–423.
- Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., LokaBharathi, P. A (2010). Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. *Mar. Drugs*. 8: 1417-1468.
- Thompson, J. D., Higgins, D. J., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties , weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Turque, A. S., Cardoso, A. M., Silveira, C. B., Vieira, R. P., Freitas, F. A. D., Albano, R. M., Gonzalez, A. M., Paranhos, R., Muricy, G., Martins, O. B. (2008). Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Biol.*, 155:135-146.
- Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A., Sugiyama, J. (1998) Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44:201–210.
- Udwary, D. W., Zeigler, L., Asolkar, R. N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P. R., Moore, B. S. (2007) Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS* 104(25): 10376–10381.
- Unson, M. D., Holland, N. D., Faulkner, D. J. (1994) A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119: 1- 11.
- Vacelet, J., Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30: 301–314.
- Wang, G. (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33:545–551.

- Webster, N. S., Hill, R. T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an  $\sigma$ -proteobacterium. *Mar. Biol.*, 138:843–851.
- Webster, N. S., Negri, A. P., Munro, M. M., Battershill, C. N. (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* 6:288–300.
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L., Hill, L. T. (2001) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 434–444.
- West, P.A., Colwell, R.R. (1984) Identification and classification of the Vibrionaceae - an overview. In: *Vibrios in the Environment* (Colwell, R.R., Ed.), pp. 285-363. John Wiley and Sons, New York.
- Wilkinson, C.R. (1987) Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. *Symbiosis.* 4: 135-146.
- Yi, H., Bae, K. S., Chun J. (2004) *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:571–576
- Ying, J-Y., Wang, B-J., Yang, S-S., Liu, S-J. (2006) *Cyclobacterium lianum* sp. nov., a marine bacterium isolated from sediment of an oilfield in the South China Sea, and emended description of the genus *Cyclobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:2927–2930.
- Yoon, J-H., Kang, K-H., Oh, T-K., Park, Y-H. (2004). *Erythrobacter aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1981–1985.
- Yoon, J-H., Kang, S-J., Lee, S-Y., Oh, T-K. (2007) *Phaeobacter daeponensis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 856–861.
- Yoon, J-H., Kim, H., Kim, I-G., Kang, K. H., Park, Y-H. (2003) *Erythrobacter flavus* sp. nov., a slight halophile from the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1169–1174.
- Yurkov, V., Stackebrandt, E., Holmes, A., 7 other authors (1994). Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll a-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44, 427–434.

- Zhang, H., Lee, Y. K., Zhang, W., Lee, H. K. (2006) Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90:159–169.
- Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y, Jin, M., Yu, X. (2008) A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93:241–248.
- Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang, F. (2009a) The Screening of Antimicrobial Bacteria with Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China Sea Sponges. *Mar Biotechnol* 11:346–355.
- Zhang, W., Zhang, F., Li, Z., Miao, X., Meng, Q., Zhang, X. (2009b) Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *Journal of Applied Microbiology* 107: 567-575.
- Zhao, Q., He, Q., Ding, W., Tang, M., Kang, Q., Yu, Y., Deng, W., Zhang, Q., Fang, J., Tang, G., Liu, W. (2008) Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate Biosynthesis. *Chemistry , Biology*, 15:693–705.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., Su, W. (2000) Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett* 188: 87–91.

**APÊNDICE 1.** Identificação, avaliação genética do potencial biotecnológico e atividade antimicrobiana das bactérias isoladas de esponjas marinhas.

Isolado	Esponja <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Avaliação Genética <sup>c</sup>			Ensaio de Difusão em bloco de ágar <sup>d</sup>		Determinação da CIM e CBM <sup>e</sup>			
			PKS-I	PKS-II	NRPS	<i>M. luteus</i> CBMAI 825	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051		<i>E. coli</i> ATCC 11775	
								CIM	CBM	CIM	CBM
B511	CE	<i>Exiguobacterium</i> sp. (CBMAI 1200)	-	+	+	13	-	2	-	-	-
B513	DR	<i>Vibrio</i> sp. (CBMAI 1201)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B515	CE	<i>Vibrio</i> sp. (CBMAI 1202)	+	+	-	20,3	11,7	1	2	-	-
B516	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	7	-	2	-	-	-
B517	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	5,3	-	-	-	-	-
B518	CE	<i>Vibrio</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B523	DR	<i>Vibrio</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B526	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	6,3	-	2	-	-	-
B532	AC	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B534	DR	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B535	PC	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B536	DR	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B538	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B540	DR	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B543	PC	<i>Bacillus</i> sp. (CBMAI 1203)	-	+	-	16	-	2	-	-	-
B544	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	12,7	-	1	-	-	-
B547	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B548	DR	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE 1. Continuação

Isolado	Esponja <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Avaliação Genética do Potencial Biotecnológico <sup>c</sup>			Ensaio de Difusão em bloco de ágar <sup>d</sup>		Determinação da CIM e CBM <sup>e</sup>			
			PKS-I	PKS-II	NRPS	<i>M. luteus</i> CBMAI 825	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051		<i>E. coli</i> ATCC 11775	
								CIM	CBM	CIM	CBM
B552	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B555	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	8,3	-	-	-	-	-
B556	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B558	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	10	-	2	-	-	-
B562	AC	<i>Erythrobacter</i> sp. (CBMAI 1204)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B565	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	11,3	-	2	-	-	-
B570	DR	<i>Aquimarina</i> sp. (CBMAI 1205)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B572	DR	<i>Bacillus simplex</i> (CBMAI 1206)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B575	DR	<i>Ruegeria</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B576	PC	<i>Erythrobacter</i> sp. (CBMAI 1207)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B579	CE	<i>Vibrio</i> sp. (CBMAI 1208)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B582	CE	<i>Vibrio</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B584	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	13,3	-	-	-	-	-
B585	AC	<i>Paracoccus</i> sp. (CBMAI 1209)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B587	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	12,3	-	-	-	-	-
B590	PC	<i>Bacillus megaterium</i> (CBMAI 1210)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B591	PC	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE 1. Continuação

Isolado	Esponja <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Avaliação Genética do Potencial Biotecnológico <sup>c</sup>			Ensaio de Difusão em bloco de ágar <sup>d</sup>		Determinação da CIM e CBM <sup>e</sup>			
			PKS-I	PKS-II	NRPS	<i>M. luteus</i> CBMAI 825	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051		<i>E. coli</i> ATCC 11775	
								CIM	CBM	CIM	CBM
B593	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	+	12,3	-	1	2	-	-
B595	PC	<i>Bacillus</i> sp. (CBMAI 1211)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B597	CE	<i>Ruegeria</i> sp. (CBMAI 1212)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B601	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B602	PC	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B605	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B608	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B615	DR	<i>Cyclobacterium marinum</i> (CBMAI 1214)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B616	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	15	-	0,5	2	0,5	2
B618	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-
B619	CE	<i>Galbibacter</i> sp. (CBMAI 1215)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B624	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	9,7	-	2	2	-	-
B626	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B627	CE	<i>Phaeobacter</i> sp. (CBMAI 1216)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B630	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B632	PC	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B634	DR	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B636	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B640	DR	<i>Bacillus pumilus</i> (CBMAI 1217)	-	+	-	10,3	-	-	-	-	-
B646	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE 1. Continuação

Isolado	Esponja <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Avaliação Genética do Potencial Biotecnológico <sup>c</sup>			Ensaio de Difusão em bloco de ágar <sup>d</sup>		Determinação da CIM e CBM <sup>e</sup>			
			PKS-I	PKS-II	NRPS	<i>M. luteus</i> CBMAI 825	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051		<i>E. coli</i> ATCC 11775	
								CIM	CBM	CIM	CBM
B647	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B657	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B659	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B661	PC	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B664	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B666	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B667	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B672	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B675	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B680	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B684	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B690	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> (CBMAI 1218)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B695	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	9,7	-	2	2	-	-
B698	DR	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B699	AC	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> (CBMAI 1220)	-	-	+	17,7	-	-	-	-	-
B700	CE	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	+	8,5	-	-	-	-	-
B701	AC	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B707	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	7	-	2	-	-	-
B709	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE 1. Continuação

Isolado	Esponja <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Avaliação Genética do Potencial Biotecnológico <sup>c</sup>			Ensaio de Difusão em bloco de ágar <sup>d</sup>		Determinação da CIM e CBM <sup>e</sup>			
			PKS-I	PKS-II	NRPS	<i>M. luteus</i> CBMAI 825	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051		<i>E. coli</i> ATCC 11775	
								CIM	CBM	CIM	CBM
B710	CE	<i>Ruegeria</i> sp. (CBMAI 1221)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B711	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B712	CE	<i>Ruegeria</i> sp. (CBMAI 1222)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B715	PC	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B718	DR	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (CBMAI 1223)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B721	CE	<i>Ruegeria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B722	AC	<i>Bacillus pumilus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B727	AC	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B729	AC	<i>Mycobacterium</i> sp. (CBMAI 1224)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B730	PC	<i>Ruegeria</i> sp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B733	PC	<i>Aestuariibacter halophilus</i> (CBMAI 1225)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B734	PC	<i>Staphylococcus</i> sp. (CBMAI 1226)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> DR = *Dragmacidon reticulata*, AC = *Axinella corrugata*, PC = *Petromica citrina* e CE = *Chelonaplysilla erecta*;

<sup>b</sup> Identificação com base na análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S;

<sup>c</sup> Presença (+) ou ausência (-) dos fragmentos dos genes alvo *PKS-I*, *II* e *NRPS*;

<sup>d</sup> Tamanho do halo de difusão em mm;

<sup>e</sup> CIM = Concentração inibitória mínima em mg/mL e CBM = Concentração bactericida mínima em mg/mL.

**ANEXO 1.** Condições de isolamento das bactérias associadas às esponjas.

<b>Código</b>	<b>Esponja</b>	<b>Meio de cultivo <sup>a</sup></b>
B511	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B513	<i>Dragmacidon reticulata</i>	MA/ASW
B515	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B516	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B517	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B518	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B523	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B526	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B532	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW
B534	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B535	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B536	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B538	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B540	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B543	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B544	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B547	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B548	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B552	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B555	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B556	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B558	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B562	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW
B565	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B570	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B572	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B575	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B576	<i>Petromica citrina</i>	MA/ASW
B579	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B582	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B584	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B585	<i>Axinella corrugata</i>	M1/ASW
B587	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B590	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW

**ANEXO 1.** Continuação.

<b>Código</b>	<b>Esponja</b>	<b>Meio de cultivo <sup>a</sup></b>
B591	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B593	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B595	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B597	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B601	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B602	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B605	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B608	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B615	<i>Dragmacidon reticulata</i>	MA/ASW
B616	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B618	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B619	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B624	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B626	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B627	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B630	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B632	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B634	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B636	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B640	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B646	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B647	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B657	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B659	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B661	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B664	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B666	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B626	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B627	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B630	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B632	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B634	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW
B636	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B640	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B646	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW

**ANEXO 1.** Continuação.

<b>Código</b>	<b>Esponja</b>	<b>Meio de cultivo <sup>a</sup></b>
B647	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B657	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B659	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B661	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B664	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B666	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B667	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B672	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B675	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B680	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B684	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B690	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B695	<i>Petromica citrina</i>	TSA/ASW
B698	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW
B699	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW
B700	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	TSA/ASW
B701	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW
B707	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B709	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B710	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B711	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B712	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW
B715	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B718	<i>Dragmacidon reticulata</i>	ISP2/ASW
B721	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	M1/ASW
B722	<i>Axinella corrugata</i>	M1/ASW
B727	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW
B729	<i>Axinella corrugata</i>	M1/ASW
B730	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B733	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW
B734	<i>Petromica citrina</i>	M1/ASW

<sup>a</sup> Todos os meios foram preparados com água do mar artificial (ASW) e a temperatura de incubação foi de 28 °C. M1 (10 g/L de amido solúvel; 4 g/L de extrato de levedura; 2 g/L de peptona; 18 g/L de Agar); MA (Marine Agar, Difco Manual, 1998); TSA (Tryptic Soy Agar, Difco Manual, 1998) e ISP2 (4 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de extrato de malte; 4 g/L de glicose; 20 g/L de Agar).