

**THIAGO SILVA DE OLIVEIRA**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS  
ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS MARINHAS  
DA CLASSE *Homoscleromorpha***



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2017**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>. Marinella Silva Laport.**

### CIP - Catalogação na Publicação

S46i Silva de Oliveira, Thiago  
Isolamento, identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de bactérias associadas às esponjas marinhas da classe Homoscleromorpha / Thiago Silva de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2017.  
60 f.

Orientadora: Marinella Silva Laport.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. atividade antimicrobiana. 2. potencial biotecnológico. 3. Homoscleromorpha. 4. bactérias associadas a esponjas. 5. resistência. I. Silva Laport, Marinella, orient. II. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

THIAGO SILVA DE OLIVEIRA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS MARINHAS DA  
CLASSE Homoscleromorpha

Rio de Janeiro, 05 de dezembro de 2017.

---

Renata Cristina Picão, Professora Adjunto, UFRJ

---

Daniel Luiz Reis Simas, Pós Doutorando, UFRJ

---

Diogo de Azevedo Jurelevicius, Professor Adjunto, UFRJ

---

Renata Martins do Souto, Professora Adjunto, UFRJ

**Ao meu tio Valdenito e a minha madrinha  
Jose (*in memorian*), que sempre me  
apoiaram e incentivaram. Hoje vocês  
continuam presentes aqui comigo,  
dentro do meu coração!**

## AGRADECIMENTO

Ao Deus do meu coração. Que me concedeu o folego de vida, uma família maravilhosa, amigos especiais e saúde para ir em busca dos meus sonhos e desejos. Que me permitiu chegar até aqui e ajudará a ir além!

Aos meus pais, Francisco e Socorro, que com muito amor e carinho moldaram o meu caráter e, com os seus exemplos, me ensinaram a ter garra e ir à luta para alcançar os meus objetivos. Não me canso de dizer o quanto amo vocês! Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim, que eu possa retribuir sempre tudo de maravilhoso que vocês já fizeram por mim. Ao meu irmão Davi, que amei desde o momento que vi a barriga da minha mãe começar a crescer. Obrigado por ser um grande amigo e por fazer comidas maravilhosas. Cabeça, te amo (mesmo nos momentos que você me irrita e dá uma vontade incontrolável de voar no seu pescoço) conta comigo sempre!

Aos meus primos e tios! Uns geograficamente próximos, outros nem tanto, mas sempre muito presentes na minha vida, nem que seja por telefone e internet. Obrigado por todo carinho e amor! Agradeço aos meus avós paternos, seu Mané Chico e Vó Nega, que hoje me abençoam lá do céu! A minha vó Judite, que faz a melhor tapioca que existe. Que apesar da distância sempre me deu muito amor e carinho, sendo paciente comigo até mesmo nos momentos em que eu aprontava alguma arte, como tentar empurra-la dentro de um guarda roupa (eu aprontava algumas quando era criança). Obrigado por tudo!

Aos meus amigos, de fora da faculdade, que me aturam desde sempre. Sou grato por ser cercado de pessoas extraordinárias, que me fazem bem e me suportam nos momentos em que eu mesmo não me aguento hahaha. Em especial, quero agradecer ao meu melhor amigo Patrick. Nunca vi duas pessoas brigarem tanto na vida, mas vai ver que é por isso que damos tão certo. E como diz a frase de uma série ótima, que ele não acha boa (já foi motivo de briga) “Ele é meu irmão. Não por uma coisa tão ‘ocasional’ como o sangue... mas por algo muito mais forte: por escolha”. Conta comigo sempre, irmão!

Quero agradecer ao maior grupo a descer do circular. Quem poderia imagina que quatro anos atrás oito pessoas completamente diferentes poderiam se juntar e formar o maior grupo que a sociedade respeita: Os microvariantes. Sou grato por ter a amizade de pessoas tão sensacionais como: Júlia, a rainha de Iguaba; Isa, a faz besteira da estrela; Fernanda, a embaixadora mundial da ONG Churrascos do Asfalto; Iva, a uva sorradeira; Victor, o BFF; e Juliana, a Julien; E a inesquecível Larissa, a pomba de Santíssimo. Obrigado por passarem comigo os momentos hilários e também os tristes. A amizade de vocês eu vou levar por toda minha vida! Um brinde à Microvariância!

Quero agradecer aos amigos que fiz na UFRJ, principalmente no time representativo de handebol. Vocês não imaginam o quanto alegam os meus dias, em meio a essas turbulências vividas durante os períodos de aula. Passamos inúmeros momentos maravilhosos e engraçados em treinos, jogos e viagens. Espero poder continuar com vocês dentro e fora de quadra! Agradeço em especial aos imensos mais sensacionais que existem: Gil, Nico, Léo, Rafa e coxinha. Obrigado pela amizade de vocês, pelos momentos de gordice, pelas risadas e pelo amor. Que venham mais anos de amizade!

Aos amigos de graduação que fiz nesses 4 anos. Aos meus companheiros de turma, por todos os momentos de sofrimento e muita alegria compartilhados. A turma mais fotogênica que

esse instituto já viu. Obrigado pela amizade de cada um. Agradeço também pela amizade e carinho dos meus veteranos e calouros. Agradeço em especial ao Renatinho por ser essa pessoa companheira, engraçada e sincera; a Veronica, com esse coração de mãe (vó) tão gigantesco e lindo; a Lívia, por ser uma pessoa fofa, mesmo quando estava sofrendo junto comigo por causa do Cruzeiro do Sul; ao Lucas, por ser muito gente boa e sempre ter uma indicação de série boa; ao Vini, por sempre ser engraçado e treteiro (mas um treteiro do amor); E ao Dener, a minha maior grata surpresa nesse semestre tão corrido e sofrido, como se fosse um trevo de quatro folhas, dono de um abraço casa que me faz muito bem. A todos vocês meu muitíssimo obrigado!

Aos amigos que ganhei nessa vida de IC, como Mell, Gabi M., Cris, Helo, Bia, Well e Amanda (que me salva com as caronas mais providenciais). Em destaque aos alunos de pós mais maravilhoso que conheço: Bruno, Gabi P., Jeey, Wess e Su, que muito me ajudaram nesses momentos de desespero do TCC, sendo solícitos em qualquer momento (incluindo madrugadas). Obrigado a todos pelo carinho, companheirismo, ensinamento e apoio.

À esta Universidade, ao Instituto de Microbiologia, seu corpo docente e administrativo. Principalmente ao André da secretaria de graduação, que sempre solícito exerceu sua função com um sorriso no rosto e muita simpatia!

À minha orientadora Marinella Laport pelas oportunidades, orientação, suporte na elaboração deste trabalho e pelo conhecimento transmitido no dia a dia.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERJ pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram para minha formação, seja direta ou indiretamente, o meu muito obrigado.

## RESUMO

THIAGO SILVA DE OLIVEIRA

### ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS MARINHAS DA CLASSE *Homoscleromorpha*

Orientadora: MARINELA SILVA LAPORT

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

As esponjas marinhas são animais sésseis e filtradores pertencentes ao filo Porifera. Esses organismos desenvolveram mecanismos de defesa eficientes, abrigando comunidades bacterianas capazes de produzir metabólitos bioativos. A classe *Homoscleromorpha* é a mais recém descrita do filo Porifera e poucos estudos abordaram a sua comunidade microbiana associada. As substâncias produzidas pela comunidade microbiana podem ser utilizadas na pesquisa de produção de antimicrobianos, pois mostraram ser ativas contra bactérias de importância médica. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar bactérias associadas às esponjas e caracterizá-las de acordo com a produção de substâncias antimicrobianas. Assim, em 2015, amostras da esponja *Oscarella* sp. MNRJ19280 e de três morfotipos de *Plakina* sp., registrados na coleção do Museu Nacional como MNRJ19261 (morfotipo azul), MNRJ 19268 (morfotipo bege) e MNRJ19272 (morfotipo laranja) foram coletados na costa da cidade de Cabo Frio, RJ. Cento e setenta e quatro unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas. No entanto, cento e sessenta e uma UFC continuaram viáveis após a criopreservação, sendo assim utilizadas para os ensaios seguintes. Deste modo, foram identificadas 42 bactérias por análise de sequenciamento do gene *rrs* (16S rRNA) e 99 por espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption/ionization - Time of flight* (MALDI-TOF). As sequências de do gene *rrs* obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank. Trinta e nove UFC foram afiliadas ao filo Firmicutes, sendo todas do gênero *Bacillus* sp.. Uma cepa pertencente ao filo Actinobacteria, gênero *Micrococcus*; e 2 cepas pertencentes ao filo Proteobacteria, identificado como *Photobacterium damsela*. Das 99 UFC identificadas por MALDI-TOF, o gênero *Bacillus* foi predominante, com exceção de cinco amostras identificadas como *Micrococcus luteus*, duas como *Lactococcus garvieae* e duas como *Enterococcus faecium*. Todas as 161 bactérias foram testadas quanto à atividade antimicrobiana por método de difusão em ágar. Quatro estirpes marinhas demonstraram atividade antimicrobiana contra estirpes padrão como *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme) e *E. faecium* ATCC 19434. Também foram inibidas bactérias resistentes a diversos antimicrobianos, como *E. coli* (resistente à ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol e tetraciclina), *E. coli* resistente à quinolona, *Streptococcus agalactiae* (resistente à tetraciclina), *S. epidermidis* (resistente à penicilina, ciprofloxacina, ampicilina e tetraciclina) e *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina. Essas descobertas sugerem que as bactérias marinhas podem representar uma nova fonte de substâncias antimicrobianas, como uma estratégia importante para o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, potencial biotecnológico, *Homoscleromorpha*, bactérias associadas a esponjas, resistência.



**ABSTRACT****THIAGO SILVA DE OLIVEIRA****ISOLATION, IDENTIFICATION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL  
ACTIVITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH MARINE SPONGE CLASS  
Homoscleromorpha****Orientadora: MARINELA SILVA LAPORT**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Sponges are sessile animals and important filter feeders belonging to the phylum Porifera. These organisms have developed efficient defense mechanisms, harboring bacterial communities capable of producing bioactive compounds. The Homoscleromorpha class is the most recent of the phylum Porifera and few researches have studied its associated microbial community. The compounds produced by microbial communities may be used in antimicrobial production research, since they have shown bioactivity against bacteria of medical importance. The aims of this study were to isolate and identify sponge-associated bacteria and to characterize them according to production of antimicrobial substances. Thus, in 2015, samples of the sponges *Oscarella* sp. MNRJ19280 and three morphotypes of *Plakina* sp., Museu Nacional voucher MNRJ19261 (morphotype blue), MNRJ 19268 (morphotype beige) and MNRJ19272 (morphotype orange) were collected in the coast of Cabo Frio city, RJ. One hundred seventy-four colony forming units (CFUs) were selected. However, one hundred sixty-one CFU continued viable after the cryopreserved process and used for further assays. To date, 42 bacteria were identified by sequencing analysis of the gene *rrs* (16S rRNA) and 99 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The 16S rRNA sequences obtained were deposited in the GenBank database. Thirty-nine CFU were affiliated to phylum Firmicutes, all being *Bacillus* sp.. One strain belonged to phylum Actinobacteria, genus *Micrococcus*; and 2 strains belonged to phylum Proteobacteria, identified as *Photobacterium damsela* were identified too. Among 99 CFU identified by MALDI-TOF, the genus *Bacillus* was predominant, except for five strains identified as *Micrococcus luteus*, two of the species *Lactococcus garvieae* and two of *Enterococcus faecium*. All 161 bacteria were assayed for antimicrobial activity by agar diffusion method. Four marine strains demonstrated antimicrobial activity against type strains as *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer) and *Enterococcus faecium* ATCC 19434. Bacteria resistant to various antimicrobials were also inhibited: *E. coli* (resistant to ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline), *E. coli* (resistant to quinolone), *Streptococcus agalactiae* (resistant to tetracycline), *S. epidermidis* (resistant to penicillin, ciprofloxacin, ampicillin and tetracycline) and *Enterococcus faecalis* (resistant to vancomycin). These findings suggest the marine bacteria may represent a new source of antimicrobial substances, as an important strategy for developing alternative therapies to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria.

**Key-words:** antimicrobial activity, biotechnological potential, Homoscleromorpha, sponge-associated bacteria, resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 –** Representação anatômica simplificada do corpo de uma esponja adulta. (A) Corte transversal, representação das camadas: mesoóio e pinacoderme (com a presença de poros em sua superfície), as câmaras dos coanócitos que formam o fluxo de água. (B) Câmara de coanócito aproximada, onde é possível notar as três camadas celulares da esponja e seus componentes: coanoderme (coanócitos), mesoóio (elementos do esqueleto – representado pela espícula, amebócitos, esclerócitos, bactérias e seus metabólitos secundários) e pinacoderme (porócitos e pinacócitos) (Adaptado de Santos-Gandelman *et al.*, 2014a). 2
- Figura 2 –** Visão geral da morfologia de uma esponja marinha e seu sistema aquífero. (A) Esquema representativo do corpo da esponja. A água do mar penetra pelos óstios, devido o batimento flagelar dos coanócitos que geram um fluxo contínuo de água, da qual estas células retiram oxigênio e alimento, e transferem aos amebócitos, que distribuem para todas as células da esponja. Por fim, a água sai pelo ósculo, levando resíduos do metabolismo celular. (B) Micrografia da câmara de coanócitos, realizado por microscopia eletrônica de varredura. Podemos observar a densidade de células microbianas que cercam os coanócitos (seta branca) e seu único flagelo (seta amarela) (Adaptado de Webster e Thomas, 2016). 3
- Figura 3 –** Relações filogenéticas entre o filo Porifera e o clado eumetazoa (A). Na visão inicial da evolução dos metazoários, as esponjas tinham uma origem monofilética e um grupo irmão do clado eumetazoa (B). Baseado em dados moleculares, Borchiellini e colaboradores (2004), propuseram uma nova hipótese filogenética, na qual as esponjas constituem quatro linhagens independentes na base da árvore, dentre as quais a classe Homoscleromorpha é a mais próxima dos eumetazoários (Ereskovsky *et al.*, 2009). 5
- Figura 4 –** Perfil taxonômico obtido por sequenciamento de nova geração, da comunidade microbiana simbiote de 81 espécies diferentes de esponjas, da água do mar e sedimento. A escala de cores demonstra a abundância relativa (em porcentagem) e os quadros pretos indicam ausência de cada um dos filos (vertical) relacionados com cada espécime e esponjas (horizontal) (Thomas *et al.*, 2016). 7
- Figura 5 –** Afiliação taxonômica e número total de cepas bacterianas isoladas de 11 espécimes do gênero *Oscarella*. Os gêneros bacterianos pertencentes aos filos (\*) Firmicutes e (+) Proteobactéria são indicados. Na coluna destacada à direita são descritos os gêneros encontrados na água do mar circundante, coletada no mesmo local das esponjas (Laport *et al.*, 2017). 10

- Figura 6** – Relação entre o número de publicações sobre produtos naturais marinhos e os filos que mais se destacam como produtores, ao longo de 50 anos. Indicado pela seta, temos o filo Porifera que sobressai como o maior produtor de compostos bioativos de origem marinha (Blunt *et al.*, 2015). 13
- Figura 7** – Estrutura química da substância bioativa dicetopiperazina ciclo- (L-Leu-L-Pro), produzida por cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas da esponja *Haliclona* sp. 14
- Figura 8** – Estrutura química do glicosídeo naftaceno SF2446A2, produzido por *Streptomyces* sp., isolado da esponja *Dysidea tupa*. 15
- Figura 9** – Ensaio de atividade antimicrobiana com bactérias isoladas da esponja *Oscarella* spp. contra *S. aureus* ATCC29213. A atividade inibitória das cepas marinhas pode ser observada pela formação de um halo de inibição da bactéria indicadora (Laport *et al.*, 2017). 15
- Figura 10** – Espécimes de esponjas marinhas da classe Homoscleromorpha coletados no litoral da cidade de Cabo Frio, RJ. (A) *Oscarella* sp. (MNRJ19280), (B) *Plakina* sp. (cor azul) (MNRJ19261), (C) *Plakina* sp. (cor creme) (MNRJ19268), (D) *Plakina* sp. (cor laranja) (MNRJ19272). (Fonte: Arquivo pessoal do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha – DMM – IMPPG - UFRJ). 17
- Figura 11** – Distribuição do total de bactérias isoladas e criopreservadas por amostra de esponja. 23
- Figura 12** – Frequência relativa de bactérias isoladas em cada meio de cultura. 24
- Figura 13** – Dados totais do rastreamento inicial de produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias marinhas isoladas contra *S. aureus* e/ou *E. coli*. 28

**LISTA DE QUADRO E TABELAS**

<b>Quadro 1</b>	– Lista publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com as bactérias resistentes a múltiplos antibióticos que apresentam um grande risco a saúde pública global nas próximas décadas.	12
<b>Tabela 1</b>	– Meios de cultura utilizados no isolamento de bactérias a partir das esponjas.	18
<b>Tabela 2</b>	– Bactérias indicadoras utilizadas nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, para se determinar o espectro de ação das bactérias SAM-positivas.	22
<b>Tabela 3</b>	– Total de bactérias isoladas e mantidas viáveis após a criopreservação, de acordo com as esponjas e meios de culturas utilizados.	23
<b>Tabela 4</b>	– Afiliação taxonômica por análise das sequências parciais do gene rrs que codifica o 16S rRNA das bactérias isoladas.	25
<b>Tabela 5</b>	– Resultado da identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF.	27
<b>Tabela 6</b>	– Testes iniciais de avaliação da atividade antibacteriana das bactérias isoladas de esponjas.	28
<b>Tabela 7</b>	– Análise do espectro de ação da atividade antimicrobiana das cepas SAM positivas frente a bactérias de importância clínica.	29
<b>Tabela 8</b>	– Relação da identificação bacteriana por MALDI-TOF e sequenciamento do 16S rRNA e suas respectivas atividades antimicrobianas.	31

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1</b> Esponjas Marinhas: Aspectos Gerais.....	1
<b>1.1.1</b> Esponjas Marinhas: Classe Homoscleromorpha.....	3
<b>1.2</b> Comunidade microbiana associada às esponjas.....	5
<b>1.2.1</b> Comunidades bacterianas associadas à classe Homoscleromorpha.....	8
<b>1.3</b> Potencial antimicrobiano de bactérias associadas às esponjas marinhas.....	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3.1</b> Objetivos gerais.....	16
<b>3.2</b> objetivos específicos.....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
<b>4.1</b> Coleta e processamento das esponjas marinhas.....	17
<b>4.2</b> Isolamento das bactérias associadas às esponjas.....	18
<b>4.3</b> Identificação das bactérias isoladas das esponjas.....	18
<b>4.3.1</b> Identificação pelo sequenciamento do gene <i>rrs</i> , codificador da subunidade 16S rRNA.....	18
<b>4.3.2</b> Identificação das bactérias por espectrometria de massa ( <i>Matrix Assisted Laser                 Desorption/ionization - Time of flight</i> – MALDI-TOF).....	19
<b>4.4</b> Teste de Produção de Substâncias Antimicrobianas (SAM).....	20
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
<b>5.1</b> Isolamento das bactérias associadas às esponjas.....	23
<b>5.2</b> Identificação das bactérias isoladas.....	24
<b>5.2.1</b> Identificação por sequenciamento do <i>rrs</i> .....	24
<b>5.2.2</b> Identificação por MALDI-TOF.....	26
<b>5.3</b> Ensaio de atividade antimicrobiana.....	28
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

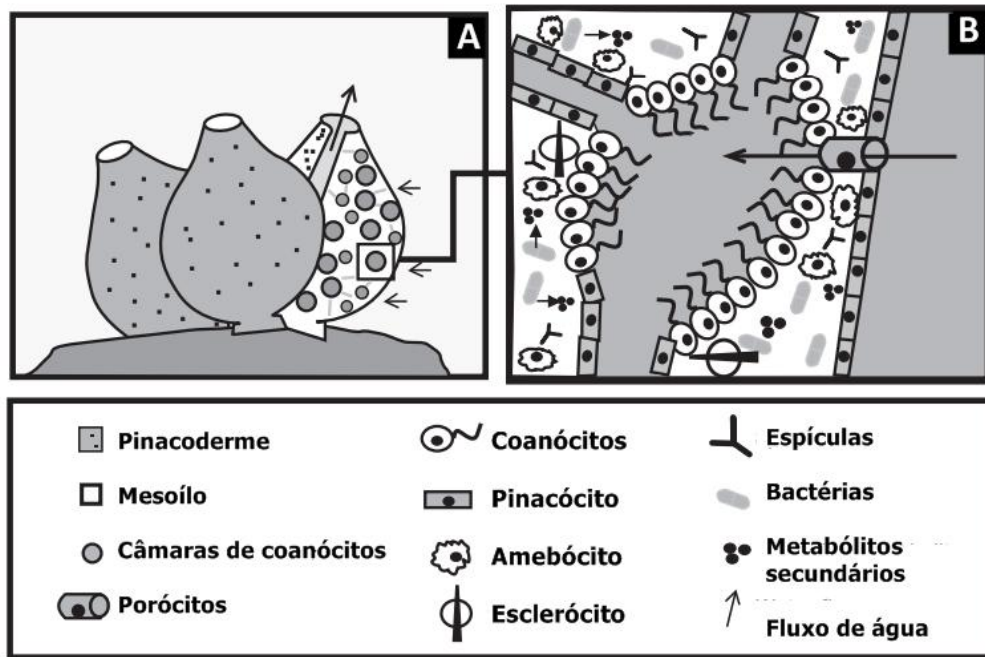
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Esponjas Marinhas: Aspectos Gerais

As esponjas marinhas são seres eucarióticos pertencentes ao filo Porifera. Representam a mais antiga linhagem de metazoários. Os registros fósseis datam para 650 milhões de anos do período Pré-Cambriano (Reitner e Wörheide, 2002; Maloof *et al.*, 2010). São animais aquáticos, sésseis, assimétricos, que podem apresentar enorme diversidade de cores, formas e tamanhos, apesar do seu baixo grau de organização celular, visto que não apresentam tecidos definidos, e suas células possuem certo grau de independência e totipotência (Simpson, 1984; Ruppert e Barnes, 1994; Hooper e van Soest, 2002).

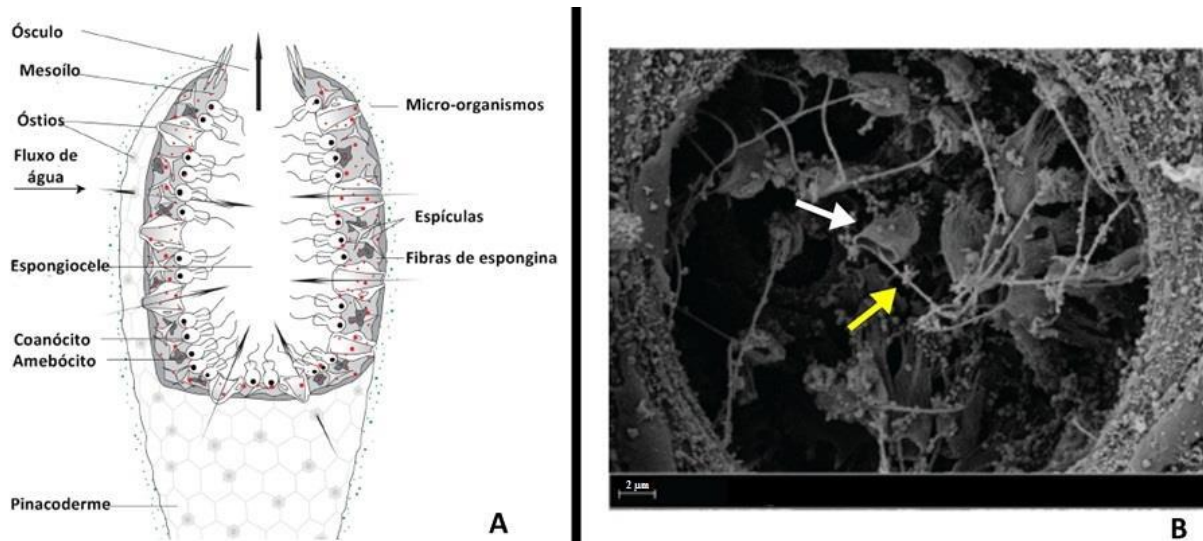
As esponjas são distribuídas por todo o globo, podendo ser encontradas desde os polos até os trópicos, habitando recifes, costões rochosos, e outros substratos, bem como, desde regiões rasas até grandes profundidades. Estes animais são encontrados, em sua maioria, em ambiente marinho, com descrições de um menor número de espécies vivendo em águas continentais (Hooper e van Soest, 2002; Hadju, Peixinho e Fernandez, 2011; van Soest *et al.*, 2012; Marconi e Pronzato, 2016).

O corpo das esponjas são organizados em basicamente três camadas: pinacoderme, mesoílo e coanoderme (Simpson, 1984). A pinacoderme é a camada que cobre toda a superfície externa e basal do corpo da esponja, além da superfície dos canais internos. Esta camada é formada por células mais achatadas denominadas pinacócitos. A camada superficial interna, coanoderme, é formada por coanócitos, células que apresentam um longo flagelo que, ao se moverem, levam à formação de uma corrente que renova a água, gerando um fluxo necessário para difusão do oxigênio e absorção de nutrientes para o organismo (Simpson, 1984; Taylor *et al.*, 2007). A região que se encontra entre a pinacoderme e a coanoderme é denominada mesoílo, onde se localizam os elementos do esqueleto como espículas de sílica (estruturas de dióxido de silício em forma de agulha) ou calcário (carbonato de cálcio), e fibras de espongina (rede de fibras proteicas exclusiva deste filo); Células totipotentes como os amebócitos; Células diferenciadas como os arqueócitos, espongiócitos e esclerócitos; Além dos micro-organismos simbiotes (Figura 1) (Simpson, 1984; Hooper e van Soest, 2002).



**Figura 1** – Representação anatômica simplificada do corpo de uma esponja adulta. (A) Corte transversal, representação das camadas: mesoilo e pinacoderme (com a presença de poros em sua superfície), as câmaras dos coanócitos que formam o fluxo de água. (B) Câmara de coanócito aproximada, onde é possível notar as três camadas celulares da esponja e seus componentes: coanoderme (coanócitos), mesoilo (elementos do esqueleto – representado pela espícula, amebócitos, esclerócitos, bactérias e seus metabólitos secundários) e pinacoderme (porócitos e pinacócitos) (Adaptado de Santos-Gandelman *et al.*, 2014a).

Na superfície mais externa da esponja estão espalhados pequenos poros inalantes chamados de óstios, formados por células tubulares chamadas de porócitos, que permitem a entrada do fluxo de água do ambiente, passando pelo corpo da esponja e sendo conduzido para uma câmara interna chamada de átrio ou espongiocele. Todos os resíduos produzidos durante o metabolismo da esponja, junto com a água, são eliminados por um canal exalante chamado de ósculo (Simpson, 1984; Taylor *et al.*, 2007). Os nutrientes necessários vêm dissolvidos no fluxo contínuo de água que permeiam os canais e câmaras do sistema aquífero distribuído pelo corpo da esponja (Figura 2) (Brusca e Brusca, 1990). Embora a maior parte das esponjas se nutram por meio da filtração, já foram descritas espécies que não possuem o sistema aquífero ou possuem de forma reduzida, sendo considerada carnívoras, pois apresentam uma superfície com espículas alteradas em forma de gancho, atuando como se fosse um velcro, que as permitem capturar passivamente e nutrir-se de pequenas presas animais, como pequenos crustáceos (Vacelet e Boury-Esnault, 1995; Vacelet e Duport, 2004; Lopes, Bravo e Hadju, 2011).



**Figura 2** – Visão geral da morfologia de uma esponja marinha e seu sistema aquífero. (A) Esquema representativo do corpo da esponja. A água do mar penetra pelos óstios, devido o batimento flagelar dos coanócitos que geram um fluxo contínuo de água, da qual estas células retiram oxigênio e alimento, e transferem aos amebócitos, que distribuem para todas as células da esponja. Por fim, a água sai pelo ósculo, levando resíduos do metabolismo celular. (B) Micrografia da câmara de coanócitos, realizado por microscopia eletrônica de varredura. Podemos observar a densidade de células microbianas que cercam os coanócitos (seta branca) e seu único flagelo (seta amarela) (Adaptado de Webster e Thomas, 2016).

Esponjas são organismos bentônicos que apresentam uma alta eficiência em filtrar grandes volumes da água circundante, obtendo deste modo oxigênio, além de matéria orgânica dissolvida e micro-organismos, que são suas fontes nutritivas (Simpson, 1984; Bell, 2008; Wulff, 2012). Esses organismos conseguem discriminar as bactérias utilizadas na nutrição das que naturalmente são albergadas (Wilkinson *et al.*, 1984). Em um estudo realizado por Wehrl, Steinert e Hentschel (2007) foi observado que as células bacterianas captadas pela filtração da água do mar foram mais rapidamente consumidas pelas esponjas do que um consórcio bacteriano derivado de esponjas. De acordo com o banco de dados *World Porifera Database*, já foram descritas aproximadamente mais de 8.881 espécies de esponjas válidas (van Soest *et al.*, 2017). Atualmente, o filo Porifera é dividido em 4 classes: Hexactinellida, Demospongiae, Calcarea e, a classe mais recentemente proposta formalmente, Homoscleromorpha (Gazave *et al.*, 2012).

### 1.1.1 Esponjas Marinhas: Classe Homoscleromorpha

A classe Homoscleromorpha abriga aproximadamente 165 espécies descritas, agrupadas em uma única ordem, Homosclerophorida, e duas famílias: Oscarillidae e Plakinidae. A família Plakinidae é composta por sete gêneros, *Aspiculophora*, *Corticium*, *Placinolopha*, *Plakina*, *Plakinastrella*, *Plakortis* e *Tetralophophora* e a família Oscarellidae é compreendida



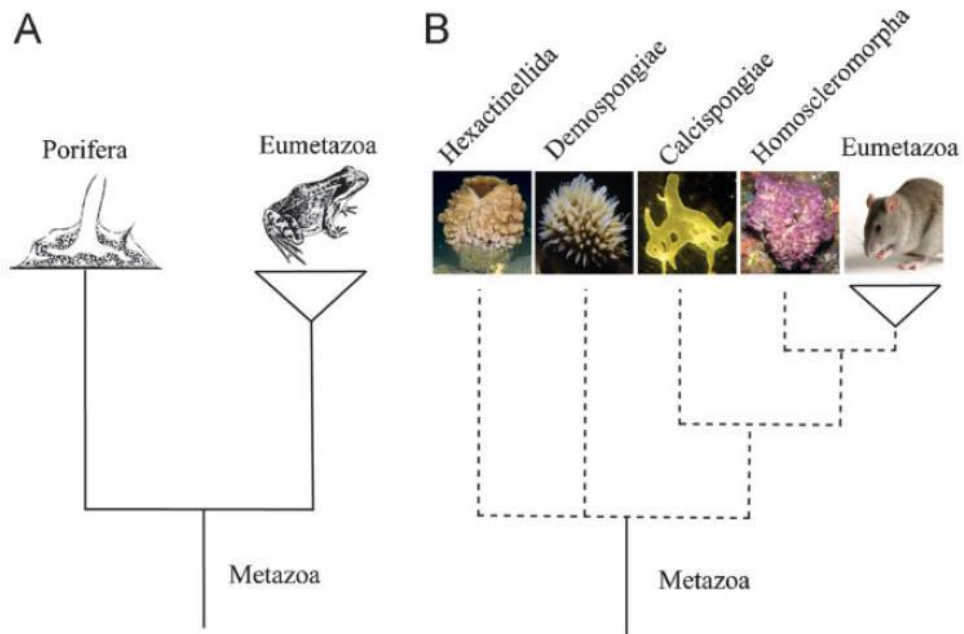
somente pelo gênero *Oscarella*. Sendo uma das classes que mais recebem caracterizações a cada ano (van Soest *et al.*, 2017).

Os organismos dessa classe são, em sua maioria, encontrados habitando águas costeiras, como as zonas entre marés, mas já foram encontradas espécies a 100 metros de profundidade. Podem crescer incrustados ou lobados em substratos, em regiões com sombra e até mesmo totalmente escuras, como cavernas subaquáticas (Ereskovsky, Ivanišević e Pérez, 2009; Pansini, Manconi e Pronzato, 2011; Gazave *et al.*, 2012).

As esponjas da classe *Homoscleromorpha* apresentam algumas características morfológicas diferentes dos demais membros do filo Porifera. Essas esponjas podem apresentar ou não espículas em sua estrutura que, se presente, são compostas por tetraedros de sílica que não formam um esqueleto bem organizado. Quando comparado com os demais membros do filo, estas esponjas são consideradas pequenas, apresentando uma delgada camada de mesoilo, com poucas células, entre a pinacoderme e a coanoderme. (Boury-Esnault *et al.*, 1995; Muricy *et al.*, 1996; Ereskovsky, 2006; Muricy e Pearse, 2004; van Soest *et al.*, 2012).

Outras peculiaridades chamam a atenção para estas esponjas, como a semelhança com características que apenas são encontradas em eumetazoários (animais que apresentam tecidos verdadeiros, conhecidos com animais superiores). Essas características incluem a presença de fibras de colágeno do tipo IV e laminina (proteínas comumente encontradas na lâmina basal de eumetazoários), além de pinacócitos e células larvais conectados por células de junção especializadas (Humbert-David e Garrone 1993; Boute *et al.*, 1996; Exposito *et al.*, 2002; Boury-Esnault *et al.*, 2003; Ereskovsky e Tokyna, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). Atrélos a essas informações, estudos filogenéticos baseados em diferentes conjuntos de dados moleculares inferiram que as esponjas pertencentes a essa classe podem estar mais próximas da linha principal da evolução animal, do que as outras esponjas. Colocando, deste modo, a *Homoscleromorpha* em uma posição importante para entender a evolução dos metazoários (Figura 3) (Borchiellini *et al.*, 2004; Nichols e Wörheide, 2005; Dohrmann *et al.*, 2008; Ereskovsky *et al.*, 2009; Gazave *et al.*, 2010, 2012).

Devido à sua distribuição, a classe *Homoscleromorpha* pode ser considerada cosmopolita, ocorrendo nos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico. Entretanto, apesar de sua importância, pouco ainda se conhece sobre a sua biodiversidade e distribuição ao redor do globo, isto provavelmente deve-se à dificuldade de acessar alguns dos habitats dessas esponjas, além das dificuldades nas análises taxonômicas (Gazave *et al.*, 2010; Pansini, Manconi e Pronzato, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Ereskovsky, Lavrov e Willenz, 2014; Domingos, Lage e Muricy, 2015).



**Figura 3** – Relações filogenéticas entre o filo Porifera e o clado eumetazoa (A). Na visão inicial da evolução dos metazoários, as esponjas tinham uma origem monofilética e um grupo irmão do clado eumetazoa (B). Baseado em dados moleculares, Borchiellini e colaboradores (2004), propuseram uma nova hipótese filogenética, na qual as esponjas constituem quatro linhagens independentes na base da árvore, dentre as quais a classe Homoscleromorpha é a mais próxima dos eumetazoários (Ereskovsky *et al.*, 2009).

Afim de obter um panorama da biodiversidade e distribuição da classe Homoscleromorpha no Atlântico Tropical Oeste (região que compreende o litoral brasileiro), Domingos, Lage e Muricy (2015) fizeram um levantamento bibliográfico por meio do qual puderam estimar que a biodiversidade dessa classe pode ser pelo menos duas vezes maior do que as atuais 27 espécies conhecidas nesta região. Atualmente, já foram descritas 538 espécies de esponjas no território Brasileiro, sendo 61 espécies endêmicas (Muricy, 2017). Mesmo com as limitações, como problemas taxonômicos gerados pela ausência ou presença de estrutura de esqueleto, podemos afirmar que a costa brasileira é um potencial reservatório da biodiversidade de Homoscleromorpha, visto que já foram encontradas várias espécies não descritas pertencentes aos gêneros *Plakinastrella*, *Plakortis*, *Oscarella* e *Plakina* (Muricy *et al.*, 2011).

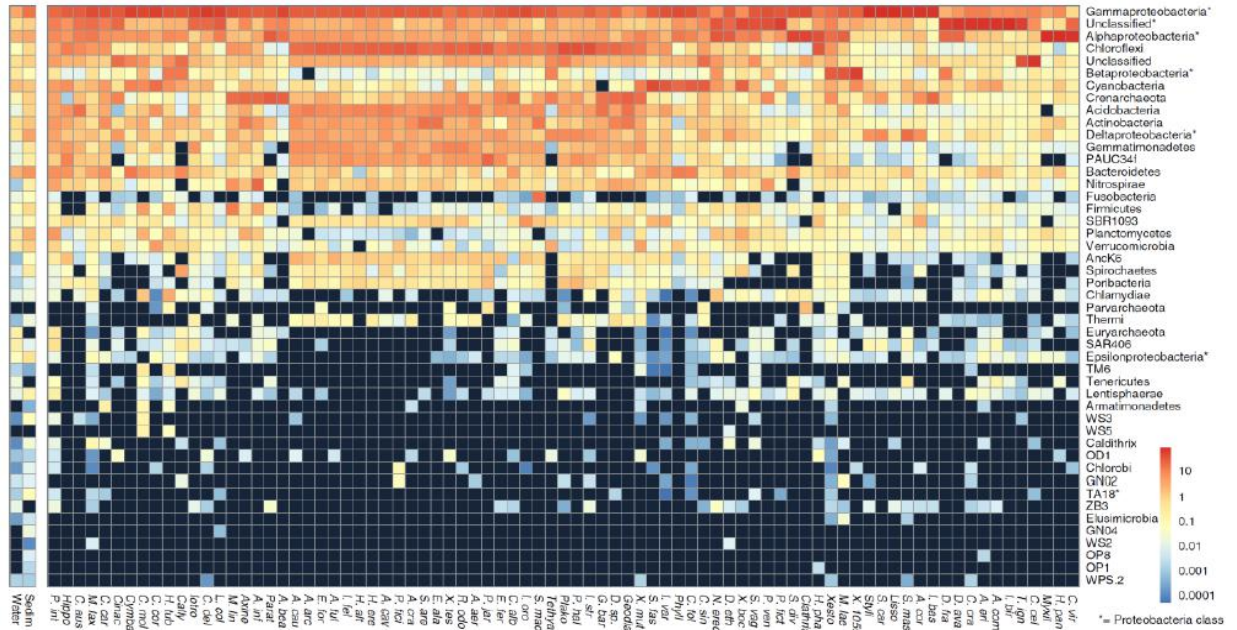
## 1.2 Comunidade microbiana associada às esponjas

Basicamente todas as superfícies internas e externas de organismos multicelulares são colonizadas por micro-organismos que formam comunidades dinâmicas e resilientes, que podem apresentar uma complexidade variável (Fischbach e Segre, 2016). O filo Porifera apresenta um dos mais antigos casos de interações ecológicas entre metazoários e comunidades

de micro-organismos. Evidências apontam que a associação surgiu no mesmo período geológico do aparecimento das esponjas, mais de 600 milhões de anos, sendo assim, as esponjas são um ótimo modelo para a compreensão da evolução do microbioma (Wilkinson 1984; Taylor *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2016).

A comunidade microbiana associada às esponjas pode constituir aproximadamente 38% do total da biomassa da esponja (Vacelet e Donadey, 1977; Hentschel *et al.*, 2012). Por meio de técnicas de microscopia eletrônica, foram observados que as esponjas marinhas podem apresentar uma variada abundância de células microbianas presentes nas camadas celulares, principalmente na região do mesoílo, apresentando baixa concentração ( $10^5 - 10^6$ ) ou alta concentração de células ( $10^8 - 10^{10}$ ), quando essa comunidade foi comparada com a da água do mar circundante ( $10^6$ ) (Lévi e Lévi, 1965; Wilkinson, 1971; Vacelet e Donadey, 1977). Posteriormente, as esponjas foram classificadas em baixa abundância microbiana (LMA – *Low microbial abundance*) em oposição às esponjas com alta abundância microbiana (HMA – *High microbial abundance*) (Hentschel, Usher e Taylor, 2006).

Utilizando técnicas independentes de cultivo foi demonstrado que a comunidade microbiana associada às esponjas é composta por membros dos três domínios da vida: Bacteria, Archaea e Eukarya (Taylor *et al.*, 2007; Simister *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016). Dados analisados por Thomas e colaboradores (2016) apontaram a grande diversidade filogenética procariótica no microbioma de 81 esponjas coletadas em diversos pontos geográficos ao redor do globo. Foram detectados três filos de arqueias e um total de 41 filos bacterianos (incluindo filos candidatos), dos quais, pelo menos 13 filos bacterianos diferentes eram encontrados em cada esponja coletada. Neste estudo, foi observado que o filo bacteriano Proteobacteria (especialmente as classes Alpha- e Gammaproteobacteria) foi dominante na maioria das esponjas analisadas, seguido pelos filos bacterianos Chloroflexi e Cyanobacteria, e pelo filo de arqueais Crenarchaeota (Figura 4).



**Figura 4** – Perfil taxonômico obtido por sequenciamento de nova geração, da comunidade microbiana simbiote de 81 espécies diferentes de esponjas, da água do mar e sedimento. A escala de cores demonstra a abundância relativa (em porcentagem) e os quadros pretos indicam ausência de cada um dos filos (vertical) relacionados com cada espécime de amostra (horizontal) (Thomas *et al.*, 2016).

A comunidade microbiana associada oferece valiosas contribuições para aspectos fisiológicos e ecológicos da esponja, bem como os simbioses que se beneficiam da esponja como um habitat rico em nutrientes, em suas camadas externas e internas, se comparado com a água do mar e o sedimento. Deste modo, as esponjas podem ser descritas como holobiontes - uma unidade evolutiva que compreende o hospedeiro, neste caso as esponjas, e todo o seu consórcio microbiano abundante e diversificado (Webster e Taylor, 2012). Esta diversidade microbiana proporciona uma ampla gama de características metabólicas e bioquímicas, fornecendo grande potencial de trocas metabólicas dentro do holobionte esponja (Hillman e Goodrich-Blair, 2016, Moitinho-Silva *et al.*, 2017). A relação hospedeiro – micro-organismo provavelmente está ligada ao sucesso evolutivo e ecológico deste filo metazoário primitivo (Lee, Lee e Lee, 2001; Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008).

O papel desempenhado pelas esponjas no funcionamento geral do ecossistema, como participar da conexão entre produção primária e secundária de matéria orgânica dissolvida e dos ciclos biogeoquímicos, já são conhecidos (Bell, 2008). Entretanto, o foco na mediação microbiana nesses processos vem aumentando, como por exemplo, a participação direta dos mesmos na ciclagem de carbono, nitrogênio, fósforo e silício (Fan *et al.*, 2012; Maldonado, Ribes e van Duyl, 2012; Ribes *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Além disso, a relação simbiótica oferece outros benefícios ao hospedeiro, como a produção de vitaminas (Thomas *et al.*, 2010);

auxílio na estabilização do arcabouço da esponja (por meio da produção de muco) (Wilkinson, 1978); captação e metabolização de metais pesados tóxicos para o hospedeiro (Santos-Gandelman *et al.*, 2014b; Santos-Gandelman *et al.*, 2014c); produção de metabólitos secundários, que são utilizados pelas esponjas como defesa química contra predadores e patógenos, na competição com outras esponjas e na homeostase da própria comunidade microbiana (Piel 2004; Ye *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015; Laport *et al.*, 2016, 2017; Satheesh, Ba-akdah e Al-Sofyani, 2016; Esteves *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Comunidades bacterianas associadas à classe *Homoscleromorpha*

As investigações sobre as comunidades bacterianas associadas às espécies de *Homoscleromorpha* ainda são escassas. No entanto, esta é uma classe recentemente descrita e que apresenta uma importância para a elucidação de como ocorreu a evolução do microbioma nos metazoários. Até então, o que se conhece a respeito da abundância microbiana de *Homoscleromorpha* foi analisada por meio de microscopia eletrônica, sendo esta abordagem indicada como um caráter adicional para classificação de esponjas que não apresentam estruturas de esqueleto (Vishnyakov e Ereskovsky, 2009; Boury-Esnault *et al.*, 2013; Gloeckner *et al.*, 2014).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) pode trazer uma estimativa da abundância bacteriana em esponjas. Tendo em vista esse recurso, foi possível observar a concentração de bactérias simbiotas em amostras do gênero *Oscarella*, classificando como esponja LMA. Diferentes morfotipos bacilares foram notados, sendo um deles mais predominante na camada do mesoílo (Pérez *et al.*, 2011; Gloeckner *et al.*, 2013; Ereskovsky *et al.*, 2015). No caso do gênero *Oscarella*, que não apresenta esqueleto em sua estrutura, as características morfológicas dos simbiotas podem auxiliar na taxonomia (Vishnyakov e Ereskovsky, 2009). No estudo realizado por Gloeckner e colaboradores (2014), por meio de MET e microscopia eletrônica de fluorescência, duas espécies do gênero *Plakortis* foram classificadas como HMA, enquanto a esponja *Oscarella lobularis* foi classificada como LMA.

No intuito de obter um maior panorama da diversidade bacteriana associada à classe *Homoscleromorpha*, Gloeckner e colaboradores (2013) utilizaram construção de bibliotecas gênicas e sequenciamento do gene *rrs*, codificador da subunidade de 16S rRNA, para analisar o holobioma de cinco espécies diferentes do gênero *Oscarella*. No estudo foram encontrados

os filos Actinobacteria, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes e Proteobacteria. Na espécie *O. lobularis* 76% das sequências pertenciam ao filo Proteobacteria (Glöeckner *et al.*, 2013).

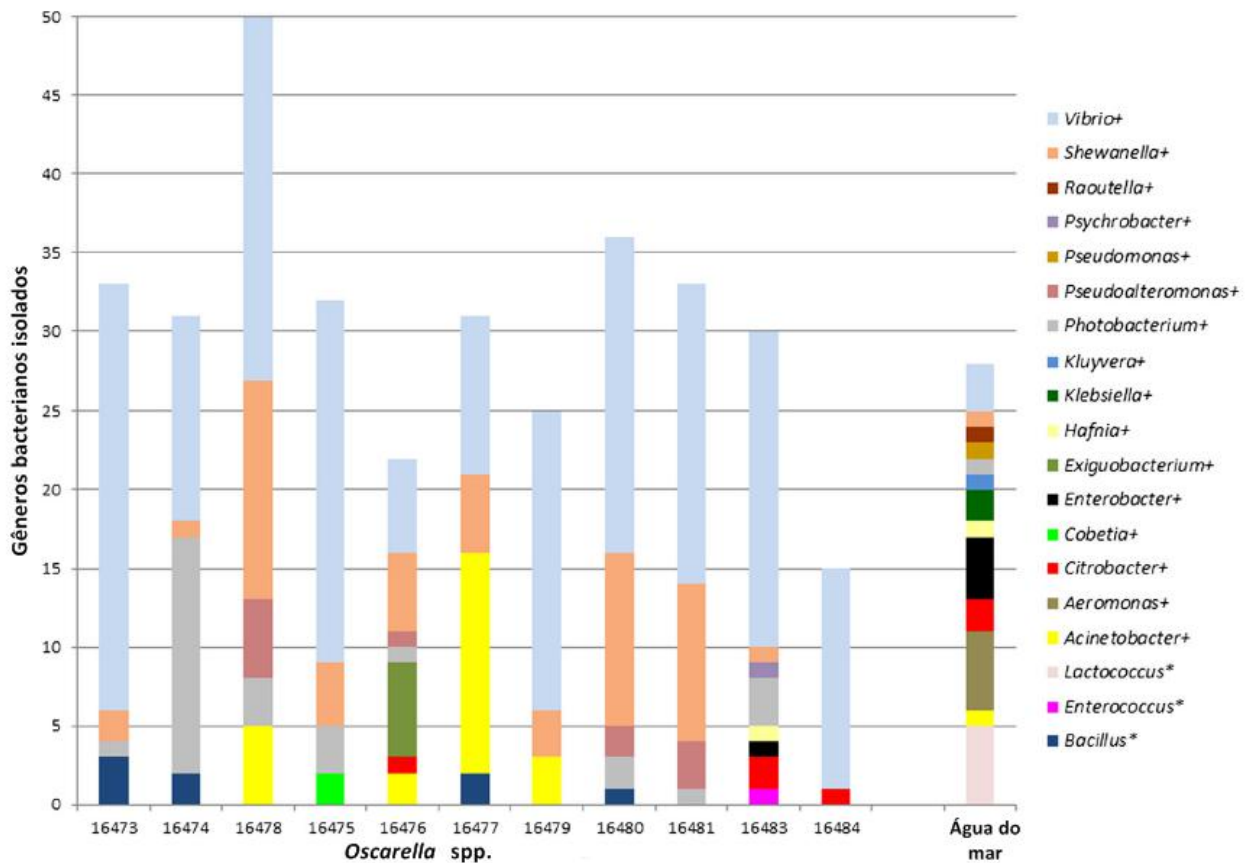
Em 2012, dados publicados por Schmitt e colaboradores, utilizaram sequenciamento de nova geração para acessar a comunidade bacteriana albergada pelas esponjas *Pseudocorticium jarrei* (gênero que em 2013 foi sinonimizado *Oscarella* por Gazave e colaboradores) e *Plakina trilopha*. A espécie *P. jarrei* apresentou um predomínio de bactérias pertencentes ao filo Chloroflexi, enquanto a *P. trilopha* apresentou um predomínio do filo Proteobacteria. Posteriormente, resultados de Thomas e colaboradores (2016), gerados por sequenciamentos na plataforma Illumina, ratificaram os achados anteriores sobre a comunidade microbiana da esponja *Pseudocorticium jarrei*. Além da predominância do filo Chloroflexi, foram detectados os filos Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Poribacteria, Proteobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobia (Thomas *et al.*, 2016).

Dentre a classe Homoscleromorpha, o gênero *Plakina* é um dos menos conhecidos quanto à sua abundância e diversidade microbiana. Em relação à abundância microbiana, o gênero *Plakina* foi considerado HMA por Glöeckner e colaboradores (2013). Em 2015, Ruiz e colaboradores descreveram uma nova espécie, *Plakina kanaky*, que foi considerada HMA, corroborando com os achados anteriores. Entretanto, recentemente, três espécies de *Plakina* foram classificadas LMA (Ruiz *et al.*, 2017). Excetuando Schmitt e colaboradores (2012), Thomas e colaboradores (2016) e Cavalcanti (Dissertação de Monografia, 2016), não existem descrições sobre a diversidade das bactérias associadas ao gênero *Plakina*.

Até o momento, poucos trabalhos abordaram as comunidades bacterianas cultiváveis da classe Homoscleromorpha (Cavalcanti, 2016; Laport *et al.*, 2017). Um dos estudos relacionados ao microbioma cultivável de Homoscleromorpha teve como objetivo isolar bactérias anaeróbias estritas. Ao total, foram isoladas 34 cepas anaeróbias estritas de quatro morfotipos simpátricos do gênero *Plakina* coletados na região de Cabo Frio – RJ em 2015. Para a identificação bacteriana foram utilizados dois métodos diferentes. Baseado no sequenciamento do gene *rrs*, codificador da subunidade 16S do rRNA, 21 bactérias isoladas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Peptoclostridium*, espécie *Clostridium bif fermentans*. O outro método utilizado para identificação das cepas foi a espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionization - Time of flight*), onde as bactérias foram classificadas predominantemente como pertencentes ao gênero *Clostridium* (Cavalcanti, 2016).

Laport e colaboradores (2017) publicaram um estudo que buscou caracterizar a estrutura da comunidade bacteriana cultivável presente em 11 amostras do gênero *Oscarella*,

coletadas na região de Cabo Frio – RJ em 2013. Ao total, 337 unidades formadoras de colônia foram filogeneticamente identificadas, por meio do sequenciamento do gene *rrs*. A comunidade cultivável foi dominada pelos filos Proteobacteria e Firmicutes, e o gênero mais frequentemente isolado foi *Vibrio*, seguido por *Shewanella* (Figura 5). Além disso, a atividade antagonista entre as bactérias isoladas do mesmo espécime (indivíduo) de esponja e entre espécimes de esponjas diferentes foi avaliada. A baixa frequência de antagonismo entre bactérias isoladas do mesmo espécime sugere que provavelmente deva ocorrer uma rede complexa de interações para compor e selecionar a comunidade associada a esponja visto que muitas delas apresentaram atividade inibitória quando testadas frente a bactérias isoladas de outras esponjas (Laport *et al.*, 2017).



**Figura 5** – Afiliação taxonômica e número total de cepas bacterianas isoladas de 11 espécimes do gênero *Oscarella*. Os gêneros bacterianos pertencentes aos filos (\*) Firmicutes e (+) Proteobactéria são indicados. Na coluna destacada à direita são descritos os gêneros encontrados na água do mar circundante, coletada no mesmo local das esponjas (Adapado Laport *et al.*, 2017).

### 1.3 Potencial antimicrobiano de bactérias associadas às esponjas marinhas

O uso extensivo e de forma inapropriada de antibióticos na criação de animais, agricultura, medicina humana e veterinária vem colaborando com o aumento da disseminação da resistência antimicrobiana, sendo frequente os relatos de bactérias resistentes a todas as classes de antimicrobianos utilizadas na medicina humana e veterinária (Doyle *et al.*, 2013; Kempf *et al.*, 2013; Jinks *et al.*, 2016; Skov *et al.*, 2016; Igrejas *et al.*, 2017). Segundo dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, a resistência antimicrobiana dentro de uma gama de agentes infecciosos tem se mostrado uma grande ameaça à saúde pública mundial, tornando possível a existência de uma era pós-antibiótica no atual século (WHO, 2014).

Com o objetivo de orientar e desenvolver a pesquisa sobre novas substâncias para enfrentar a crescente resistência das bactérias aos antimicrobianos, a OMS elaborou um catálogo com 12 patógenos prioritários. Os micro-organismos, que representam uma grande ameaça mundial nas próximas décadas, foram divididos em três classes, de acordo com alguns parâmetros, como a severidade das infecções que causam e o número de antimicrobianos disponíveis para tratamento. O grupo que recebeu a maior prioridade é composto por bactérias resistentes a uma grande quantidade de antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de terceira geração e carbapenemas, antimicrobianos potentes para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos multiresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os micro-organismos que foram classificados como críticos são majoritariamente relacionados com casos de infecções hospitalares, principalmente em situações que utilizam dispositivos médicos como cateteres. Como exemplo, temos a espécie *Acinetobacter baumannii*, líder da lista. Nas categorias alta e média prioridade, os segundo e terceiro níveis estão outras bactérias, cada vez mais resistentes aos antimicrobianos, que causam algumas doenças mais comuns. Entre elas encontram-se o agente etiológico da gonorreia, *Neisseria gonorrhoeae*, e bactérias que causam intoxicação e infecção alimentar, como *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., respectivamente (Quadro 1) (WHO, 2017; Willyard, 2017).

Em contraponto ao aumento da disseminação da resistência aos antimicrobianos, vemos uma queda nas descobertas de substâncias eficientes e viáveis para o tratamento frente a esses agentes infecciosos. Em comparação, atualmente, nos Estados Unidos da América, existem centenas de substâncias contra o câncer em desenvolvimento clínico para o mercado. Em contraparte, há apenas 40 novos antimicrobianos em teste. Deste modo, é imprescindível a

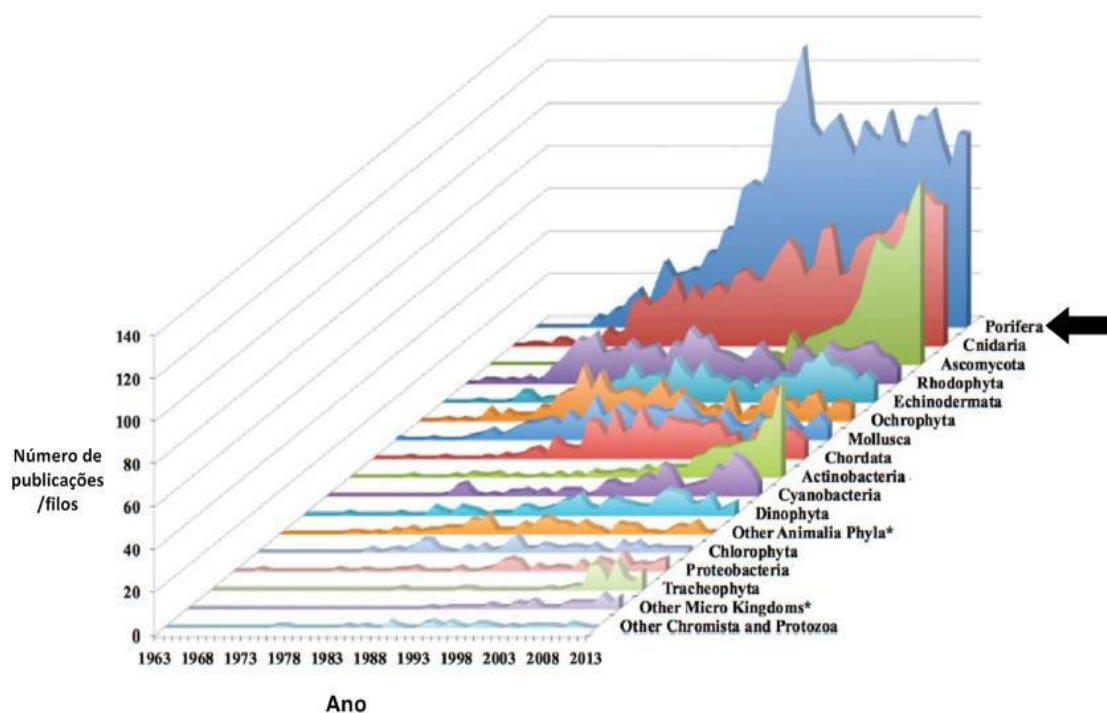


busca por novos fármacos para compor o arsenal terapêutico contra estes micro-organismos multirresistentes (Santos-Gandelman *et al.*, 2014a; Blunt *et al.*, 2015, 2017; Willyard, 2017).

**Quadro 1** – Lista publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com as bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos que apresentam um grande risco a saúde pública global nas próximas décadas.

Prioridade 1: Crítica
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente aos carbapenêmicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente aos carbapenêmicos
<i>Enterobacteriaceae</i> , resistente aos carbapenêmicos, produtora de betalactamases de espectro estendido
Prioridade 2: Alta
<i>Enterococcus faecium</i> , resistente à vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente à meticilina, com sensibilidade intermediárias e resistência à vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i> , resistente à claritromicina
<i>Campylobacter</i> spp., resistente às fluoroquinolonas
<i>Salmonellae</i> , resistente às fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente à cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas
Prioridade 3: Média
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , resistente à penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente à ampicilina
<i>Shigella</i> spp., resistentes às fluoroquinolonas

Desde a década de 1960, já se observava a busca por novos produtos naturais com propriedades bioativas para o tratamento de diferentes doenças, levando pesquisadores a procurarem por substâncias que apresentassem novas estruturas químicas e novos mecanismos de ação. Atrelado a essa necessidade, o desconhecido ambiente marinho começou a demonstrar grande parte de seu potencial como reservatório de diversidade biológica e química (Pinto *et al.*, 2002; Montaser e Luesch, 2011; Blunt *et al.*, 2017). No ano de 2017, Blunt e colaboradores publicaram uma revisão bibliográfica sobre as publicações que descreviam substâncias isoladas em ambientes marinhos até o ano de 2015. As primeiras publicações são do ano de 1963, onde foram publicados apenas quatro artigos, em que somente um artigo continha novas substâncias. Em contraponto, em 2015, foram descritas 13.408 novas substâncias. Ao longo desses 52 anos, o filo Porifera se destacou como o maior em número de substâncias bioativas conhecidas e isoladas em ambientes marinhos (Figura 7) (Blunt *et al.*, 2017).



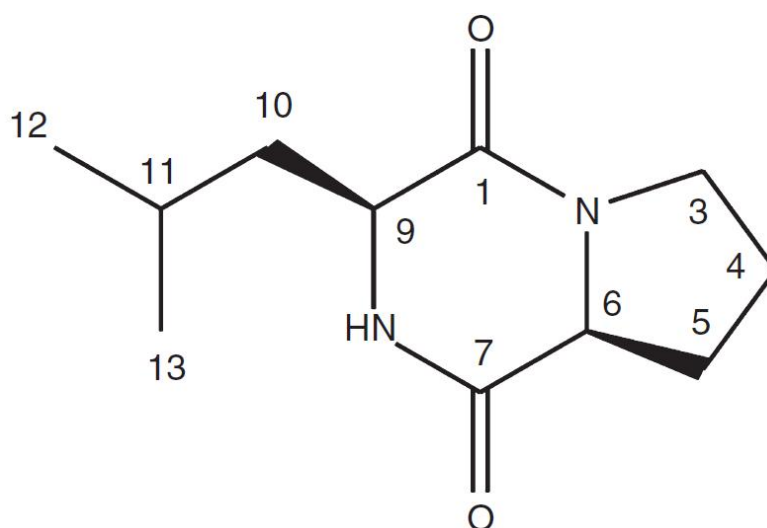
**Figura 6** – Relação entre o número de publicações sobre produtos naturais marinhos e os filios que mais se destacam como produtores, ao longo de 50 anos. Indicado pela seta, temos o filo Porifera que sobressai como o maior produtor de compostos bioativos de origem marinha (Adaptado de Blunt *et al.*, 2015).

As esponjas marinhas são conhecidas produtoras de moléculas bioativas, que apresentam alta diversidade química como terpenoides, alcaloides, nucleosídeos, peptídeos, ácidos graxos, esteróis e muitos outros. Já foram descritas substâncias que apresentam atividade antibacteriana, antiviral, anti-helmíntica, antiprotozoária, antibiofilme e antitumoral. O Filo Porifera é o maior em número de substâncias submetidas a testes de triagem pré-clínica e clínica, enfatizando, deste modo, o potencial das esponjas como uma fonte valiosa de moléculas que apresentam aplicação farmacológica. Como exemplo de fármaco bem-sucedido, temos a Citarabina (Ara-C) e a Vidarabina (Ara-A), que apresentam atividades antitumoral e antiviral, respectivamente. Essas moléculas são derivadas de nucleosídeos isolados da esponja marinha *Cryptotethya crypta* (Proksch, Edrada e Ebel, 2002; Laport, Santos e Muricy, 2009; Santos-Gandelman *et al.*, 2014a; Blunt *et al.*, 2015; Mioso *et al.*, 2017).

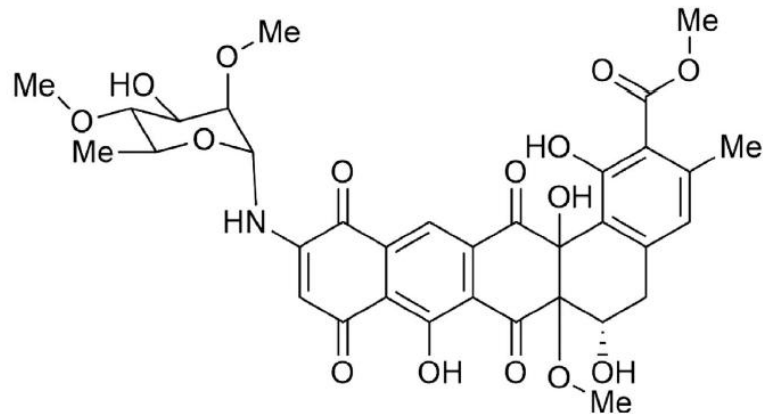
Nas últimas décadas, algumas evidências sugeriram que as bactérias associadas às esponjas poderiam ser a real fonte de algumas dessas substâncias bioativas (Piel, 2004; Radjasa *et al.*, 2007). Uma pesquisa conduzida por Bewley, Holland e Faulkner (1996), investigou a origem da substância antitumoral *swinholid* A, isolada da esponja *Theonella swinhoei*. Por meio de centrifugação diferencial, as populações de células nas amostras de esponjas foram separadas e posterior as análises cromatográficas, foi observado que a fração que apresentou

atividade era composta por uma mistura de bactérias. Outro fator que corrobora com a indicação das bactérias simbiotes como verdadeira fonte de alguns metabólitos bioativos isolados em esponjas é a descrição de moléculas que, até então, são exclusivamente produzidas por bactérias como alguns policetídeos e peptídeos não-ribossomais (glicopeptídeos) (Laport, Santos e Muricy, 2009; Khan *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015). Dentre os filos bacterianos associados à Porifera, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes e Proteobacteria são os que mais se destacam na produção de metabólitos que apresentam características antimicrobianas relevantes (Williams, 2009).

Três cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, isoladas da esponja marinha *Haliclona vansoesti*, demonstraram ter uma eficaz atividade antimicrobiana. Quando testadas frente a cepas de importância clínica, essas bactérias marinhas foram capazes de inibir o crescimento de *K. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *Escherichia coli* multirresistente, *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Santos *et al.*, 2010). Mais recentemente, nosso grupo de estudo também descreveu a substância bioativa dicetopiperazina ciclo-(L-Leu-L-Pro), produzida pelas duas cepas de *Pseudomonas fluorescens*, isoladas da esponja *Haliclona vansoesti*. A molécula demonstrou atividade bactericida contra cepas de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 7) (Santos *et al.*, 2015). Ainda em 2015, Reimer e colaboradores descreveram o glicosídeo naftaceno SF2446A2, produzido por uma cepa de *Streptomyces* sp. associada à esponja *Dysidea tupha*. A substância apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento da bactéria *Chlamydia trachomatis*, relacionada a infecções sexualmente transmissíveis (IST), mais especificamente a doença inflamatória pélvica (Figura 8) (Reimer *et al.*, 2015).

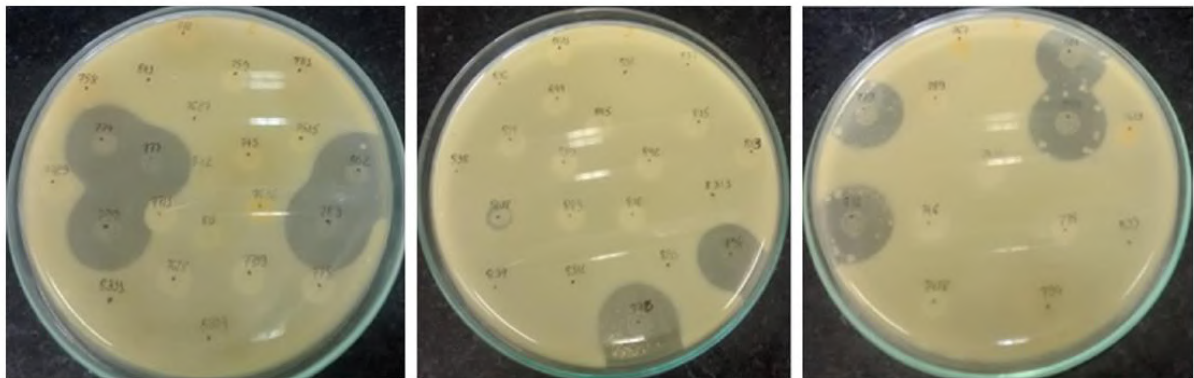


**Figura 7** – Estrutura química da substância bioativa dicetopiperazina ciclo-(L-Leu-L-Pro), produzida por cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas da esponja *Haliclona vansoesti* (Santos *et al.*, 2015).



**Figura 8** – Estrutura química do glicosídeo naftaceno SF2446A2, produzido por *Streptomyces* sp., isolado da esponja *Dysidea tupha* (Reiner *et al.*, 2015).

Devido aos poucos trabalhos explorando a comunidade bacteriana cultivável associada a esponjas da classe Homoscleromorpha, o conhecimento acerca do potencial antimicrobiano dessas bactérias é ínfimo (Cavalcanti, 2016; Laport *et al.*, 2017). Deste modo, nenhuma substância bioativa ainda foi descrita a partir da produção de bactérias associadas à classe Homoscleromorpha. Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana, Laport e colaboradores (2017) investigaram a produção de metabólitos ativos por meio de testes de inibição cruzada entre cepas marinhas isoladas de 11 espécimens/amostras diferentes do gênero *Oscarella*, e avaliação da inibição do crescimento de bactérias de interesse médico. Entre 85 cepas marinhas testadas, 27 delas apresentaram atividade inibitória contra ao menos uma cepa clínica. Em sua maioria, a atividade inibitória foi observada frente a *S. aureus*, mas foi observada bioatividade contra outras cepas médicas, tais como MRSA, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus hominis* (Figura 8) (Laport *et al.*, 2017).



**Figura 9** – Ensaio de atividade antimicrobiana com bactérias isoladas da esponja *Oscarella* spp. contra *S. aureus* ATCC29213. A atividade inibitória das cepas marinhas pode ser observada pela formação de um halo de inibição da bactéria indicadora (Laport *et al.*, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

O litoral do Brasil, com mais de 8.000 Km, apresenta uma enorme biodiversidade devido a uma série de fatores ecológicos favoráveis como o clima, temperatura e riqueza de nutrientes. Apenas no território Brasileiro, já foram descritas mais de 530 espécies de esponjas marinhas, das quais 61 são espécies endêmicas, valor que equivale a aproximadamente 6% de toda diversidade mundial conhecida. Atrélada a essa riqueza de esponjas, temos uma comunidade microbiana que demonstra um grande potencial para aplicações biotecnológicas.

Poucos estudos têm abordado a comunidade bacteriana cultivável associada à classe Homoscleromorpha, bem como a sua capacidade de produção de substâncias antimicrobianas. Tendo em vista a crescente problemática da disseminação da resistência aos antimicrobianos entre diferentes classes de agentes infecciosos, é razoável supor que o holobioma das esponjas marinhas constitui um reservatório valioso de substâncias bioativas para a pesquisa de novos agentes antimicrobianos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo isolar e identificar bactérias associadas à esponja *Oscarella* sp. e 3 morfotipos simpátricos da esponja *Plakina*, ambas da classe Homoscleromorpha, além de avaliar a produção de substâncias que apresentem atividade antibacteriana frente a bactérias de interesse clínico.

### 3.2 Objetivos específicos

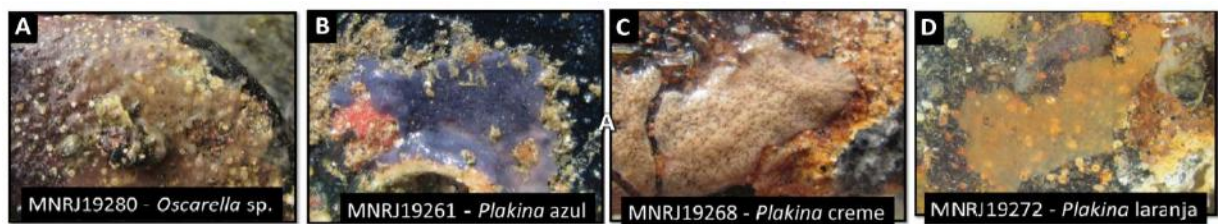
1. Isolar bactérias associadas a três morfotipos da esponja *Plakina* sp. e uma espécie de *Oscarella*, encontradas na Poça do Carolina em Cabo Frio, RJ;
2. Identificar as bactérias marinhas isoladas das esponjas;
3. Avaliar a capacidade da produção de substâncias antimicrobianas (SAM) pelas bactérias isoladas com ação contra cepas-padrão e cepas de importância médica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e processamento das esponjas marinhas

As esponjas utilizadas neste projeto foram coletadas da poça de maré “do Carolina” (22°53'14”S-42°00'18”O), localizada no litoral da cidade de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. Os espécimens foram coletados pelo Prof. Dr. Guilherme Muricy, do Departamento de Invertebrados, Museu Nacional – UFRJ e pelo nosso grupo de pesquisa. Com o auxílio de um bisturi estéril, foram coletadas amostras (cerca de 3-5 cm<sup>2</sup>) de *Plakina* sp. (cor azul) (voucher de identificação: MNRJ19261), *Plakina* sp. (cor creme) (MNRJ19268), *Plakina* sp. (cor laranja) (MNRJ19272) e *Oscarella* sp. (MNRJ19280) (Figura 10). As amostras foram lavadas com água do mar artificial estéril [NaCl a 2,34% (p/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 0,49% (p/v), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O a 0,4% (p/v), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O a 0,15% (p/v), KCl a 0,075% (p/v), NaHCO<sub>3</sub> a 0,017% (p/v)] no local da coleta, para retirar sedimento ou qualquer outro objeto ou macro-organismo aderido, e adicionadas em tubos contendo meio de cultura BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*), BHI diluído 1:10, Marine, R2A (Reasoner's 2A) e Nutriente, mantidos à temperatura ambiente.

No laboratório, sob condições assépticas, as amostras de esponjas foram maceradas com bastões de vidro no mesmo meio de cultura utilizado para o seu transporte, até obtermos um macerado homogêneo.



**Figura 10** – Espécimes de esponjas marinhas da classe Homoscleromorpha coletados no litoral da cidade de Cabo Frio, RJ. (A) *Oscarella* sp. (MNRJ19280), (B) *Plakina* sp. (cor azul) (MNRJ19261), (C) *Plakina* sp. (cor creme) (MNRJ19268), (D) *Plakina* sp. (cor laranja) (MNRJ19272) (Fonte: Arquivo pessoal do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha – DMM – IMPPG - UFRJ).

### 4.2 Isolamento das bactérias associadas às esponjas

Posterior a etapa de processamento das amostras de esponja, as diluições dos extratos nas concentrações 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar BHI, BHI diluído 1:10, R2A, Marine e Nutriente (Tabela 1), adicionados de cicloheximida (1µg/mL). Por conseguinte, as placas foram incubadas em temperatura ambiente (± 25 °C) e a

partir de 24 h de incubação, as culturas bacterianas foram diariamente examinadas para observar o seu crescimento. Assim, duas a três colônias de cada morfotipo foram selecionadas e estas foram semeadas pelo método de esgotamento a fim de se obter culturas puras, a seguir, cada bactéria foi criopreservada em meio BHI adicionado de glicerol 30% a -20 °C.

**Tabela 1:** Meios de Cultura utilizados no isolamento de bactérias a partir das esponjas.

Meio de Cultura	Composição
BHI	Comercial (Difco). Solução em água destilada (m/v): 3,7%, ágar 1,5% (Difco).
BHI diluído 1:10	Comercial (Difco). Solução em água destilada (m/v): 0,37%, ágar 1,5% (Difco).
Marine	Comercial (Difco). Marine 3,74%, ágar 1,5% (Difco).
R2A	Comercial (Difco). Solução em água destilada (m/v): Ágar R2A 1,82%.
Nutriente	Comercial (Difco). Solução em água destilada (m/v): Ágar Nutriente 2,3%.

A nomenclatura da UFC (unidade formadora de colônia) selecionada foi dada da seguinte maneira: os dois últimos dígitos do Voucher de identificação + sigla referente ao nome do meio de cultura onde a bactéria foi isolada + a ordem de isolamento da UFC no meio de cultura (Ex. 80R2A1: Bactéria isolada da esponja *Oscarella* sp. MNRJ19280, no meio de cultura R2A, 1<sup>a</sup> UFC isolada).

### 4.3 Identificação das bactérias isoladas das esponjas

#### 4.3.1 Identificação pelo sequenciamento do gene *rrs*

O DNA das bactérias isoladas foi obtido por meio de lise térmica. As colônias foram crescidas em meio ágar BHI em 25°C. Após 24 horas de incubação, três a cinco colônias bacterianas foram ressuspensas em 25 µL de água deionizada estéril, em seguida, essas células foram rompidas por aquecimento a 100 °C durante 15 minutos.

Posterior a obtenção do DNA, foi realizada a amplificação das sequências dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), utilizando os seguintes componentes, para um volume total de 25 µL de reação: 1,5 µL do lisado celular, 12,5 µL de tampão 2x GoTaq G2 Green Master Mix (Promega), 0,2 µL de BSA 50 mg/mL (Sigma-Aldrich), 1,2 µL de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich), 7,1 µL de água destilada estéril, 0,5 µL de

cada iniciador universal, na concentração de 20 pmol, 27F (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). O termociclador foi configurado para as seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 6 min; seguido de 30 ciclos de amplificação, que consistiam em 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min e 30 s de anelamento a 55°C, 2 min de extensão a 72°C; e uma etapa de extensão final por 5 min a 72°C (Laport *et al.*, 2016).

A confirmação do tamanho dos amplicons gerados, de aproximadamente 1,4 kb, foi realizada de acordo com Sambrook e Russell (2001), através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) preparado em tampão TBE 0,5x (89 mM de Tris-HCl, 89 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,2). Uma alíquota do marcador de tamanho de DNA (1 kb DNA Ladder - Promega) foi aplicada aos géis contendo os amplicons a serem analisados. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com tampão TBE 0,5x, a 80 V por aproximadamente 45 min. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 min. Posteriormente, foi observado no transiluminador de luz UV e fotografado pelo Sistema de Foto documentação Doc-PrintII (Vilber Lourmat, Berlim, Alemanha).

Após a confirmação dos tamanhos, os amplicons foram purificados com o kit comercial *QIAquick – PCR Purification kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os amplicons purificados foram sequenciados pela empresa de prestação de serviços BPI (Biotecnologia Pesquisa e Inovação), utilizando o sequenciador ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No sequenciamento foi utilizado o iniciador 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') para a reação de amplificação. As sequências geradas foram revisadas e editadas, de acordo com a necessidade, no software Sequence Scanner 2. Após isso, as sequências foram alinhadas e classificadas taxonomicamente de acordo com o banco de dados de genes rRNA e ferramentas do portal SILVA (Pruesse, Peplies e Glöckner, 2012), a seguir, as sequências foram depositadas no banco de dados Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **4.3.2 Identificação das bactérias por espectrometria de massa (*Matrix Assisted Laser Desorption/ionization - Time of flight - MALDI-TOF*)**

Para a identificação bacteriana utilizando a tecnologia MALDI-TOF, as bactérias marinhas foram crescidas no meio de cultura ágar BHI, em temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) por 24 h. Em fluxo laminar, posterior a incubação, as colônias isoladas foram coletadas com auxílio



de agulhas bacteriológicas estéreis e em seguida depositadas, em duplicata, na placa metálica (Sample target) utilizada no espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics). Após a completa secagem do material bacteriano, foi adicionado a cada amostra, 1  $\mu$ L da matriz composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%. A cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para calibrar as análises e como controle do processamento das amostras. Transcorrido o tempo necessário para a secagem da mistura e, conseqüentemente, a formação dos cristais, a placa de metal foi inserida no aparelho para a leitura das amostras.

Os espectros de massa das amostras foram obtidos no modo linear, com os seguintes parâmetros: frequência do laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18,6 kV respectivamente; faixa de massa molecular 2.000 a 20.000 Da. Os espectros de massa foram coletados através do somatório de 240 disparos do laser, adquiridos através de 4 grupos de 60 disparos lançados em regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, em um poço contendo a amostra alvo na placa metálica. O espectro das proteínas ribossômicas da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  foram utilizados como referência para calibrar o equipamento. Após esta calibração, os espectros de massa obtidos para cada amostra foram processados pelo software Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics), que realizou uma pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência para encontrar o espectro que mais se assemelhava ao obtido com a referida amostra.

O software designou os dez micro-organismos que apresentaram maior semelhança com a amostra testada, organizados de acordo com a pontuação (score) obtida, que variou entre 0,0 e 3,0. De acordo com o fabricante, o critério sobre a identificação bacteriana ocorreu da seguinte maneira: Score igual ou maior que 2,3 foi considerado como identificação altamente confiável para a espécie, entre 2,00 e 2,29 foi considerado como identificação confiável para o gênero e provável para espécie bacteriana, score entre 1,70 e 1,9 foi considerado como identificação provável apenas para o gênero bacteriano, enquanto escores de identificação abaixo de 1,69 foram classificados como não confiáveis.

#### **4.4 Teste de Produção de Substâncias Antimicrobianas (SAM)**

Para investigar a produção de substâncias com atividade antimicrobiana, foi realizado um ensaio pelo método de difusão em meio sólido, conforme descrito anteriormente por Marinho e colaboradores (2009). As cepas marinhas foram crescidas em 3 mL de caldo BHI e incubadas em temperatura ambiente até apresentarem uma concentração de células necessária, que foi observada por meio da turbidez do meio de cultura. Em seguida, alíquotas de 10  $\mu$ L do

caldo foram aplicadas em forma de ponto na superfície do ágar BHI, em uma placa de Petri. As placas de Petri foram incubadas por 24 h ou até apresentar uma massa de células puntiforme (*spots*), em temperatura ambiente. Em paralelo, as bactérias indicadoras do teste foram cultivadas em 3 mL de caldo BHI por 24 h a 37 °C.

Ao apresentarem o crescimento por tempo necessário, as placas foram expostas a vapores de clorofórmio, por um período de 40 min, para que ocorresse a morte das cepas marinhas. Para garantir a total evaporação do clorofórmio, as placas foram mantidas por mais 15 min a 37 °C. No passo seguinte, 30 µL do caldo contendo a bactéria indicadora foram homogeneizados em 3 mL de meio BHI semissólido [Comercial (Difco)]. Solução em água destilada (m/v): 3,7%, ágar 0,75% (Difco)], e essa mistura foi vertida sobre a superfície das placas contendo as cepas marinhas. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, por se tratarem de bactérias clínicas. Decorrido o tempo de incubação, foi observada a presença ou ausência de um halo de inibição do crescimento das bactérias indicadoras ao redor das cepas marinhas possivelmente produtoras de substâncias antimicrobianas. Todos os testes foram realizados em duplicata, em casos de discordância, uma triplicata foi realizada. Foram consideradas bactérias SAM-positivas aquelas que apresentaram halos de inibição com diâmetros  $\geq 8$  mm, pois este é o tamanho médio dos *spots* das bactérias marinhas (Marinho *et al.*, 2009).

No processo de triagem inicial, todas as bactérias isoladas foram testadas frente às bactérias indicadoras *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizadas como cepas padrão de bactéria gram-positiva e gram-negativa, respectivamente. As cepas marinhas que consideradas SAM-positivas foram testadas frente a outras bactérias de importância médica, incluindo multirresistentes, a fim de conhecermos o espectro da atividade antibacteriana. A lista de bactérias clínicas utilizadas, bem como suas características relevantes estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Bactérias indicadoras utilizadas nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, para se determinar o espectro de ação das bactérias SAM-positivas.

Cepas padrão	Características relevantes	Referências
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Produtora de polissacarídeo utilizado para adesão (formadora biofilme)	ATCC
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	----	ATCC
Cepas clínicas	Características relevantes	Referências
<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistente à vancomicina	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Resistente à ampicilina, metilicina, penicilina (MRSA)	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Resistente à ampicilina, ciprofloxacina, penicilina, tetraciclina	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	----	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Resistente à tetraciclina	3
<i>Citrobacter freundii</i>	Resistente aos aminoglicosídeos, betalactâmicos, macrolídeos e quinolonas	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	ESBL +	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	Resistente à quinolonas e betalactâmicos	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3	Resistente à aminoglicosídeos	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à aztreonam, piperacilina/tazobactam	1
<i>Enterobacter</i> sp.	Resistente aos aminoglicosídeos	3
<i>Escherichia coli</i> 1	Resistente à ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina	1
<i>Escherichia coli</i> 2	Resistente à quinolonas	3

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina; ESBL: beta-lactamases de espectro estendido; ----: o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos não foi analisado pelo laboratório de origem; ATCC: American Type Culture Collection; 1. Coleção do Laboratório de Infecção Hospitalar, IMPPG, UFRJ; 2. Cepas sequenciada pelo *The Institute for Genomic Research* (TIGR) (<http://cmr.tigr.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=gef>); 3. Coleção do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, IMPPG, UFRJ

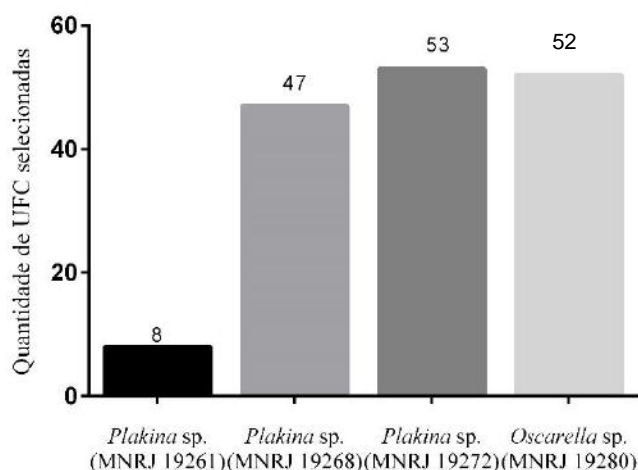
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Isolamento das bactérias associadas às esponjas

Ao total foram selecionadas 174 UFC, entretanto, após a criopreservação, 161 UFC permaneceram viáveis. Os resultados a seguir correspondem as 161 bactérias viáveis (Tabela 3). Foram selecionadas 8 UFC da esponja *Plakina* sp. cor azul (MNRJ19261), 49 UFC da *Plakina* sp. cor creme (MNRJ19268), 59 UFC da *Plakina* sp. cor laranja (MNRJ19272) e 58 UFC da esponja *Oscarella* sp. (MNRJ19280) (Figura 11).

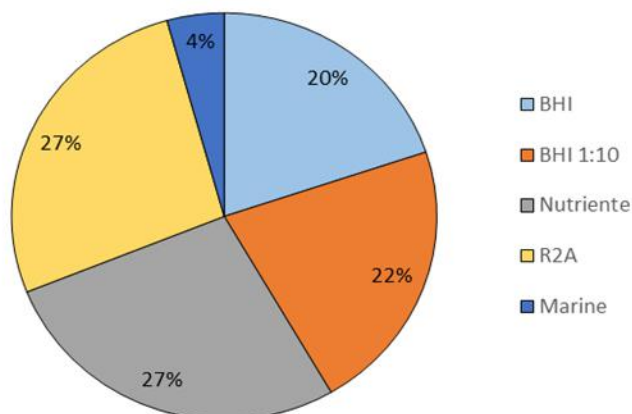
**Tabela 3** – Total de bactérias isoladas e mantidas viáveis após a criopreservação, de acordo com as esponjas e meios de culturas utilizados.

Esponjas → Meios de cultura ↓	<i>Plakina</i> sp. (MNRJ 19261)	<i>Plakina</i> sp. (MNRJ 19268)	<i>Plakina</i> sp. (MNRJ 19272)	<i>Oscarella</i> sp. (MNRJ 19280)	Total de UFC por meio de cultura
BHI	0	9	9	14	32
BHI 1:10	4	11	9	11	35
Nutriente	3	16	10	15	44
R2A	1	11	24	7	43
Marine	0	1	1	5	7
Total de UFC por esponja	8	48	53	52	161



**Figura 11** – Distribuição do total de bactérias isoladas e criopreservadas por amostra de esponja.

Em relação aos meios de cultura utilizados, foram isoladas 32 UFC no meio ágar-BHI (equivalente a 20% do total), 35 UFC no ágar-BHI diluído 1:10 (22%); 44 UFC no R2A (27%), 44 UFC no ágar-Nutriente (27%) e 7 UFC no meio ágar-Marine (4%) (Figura 12).



**Figura 12** – Frequência relativa de bactérias isoladas em cada meio de cultura.

## 5.2 Identificação das bactérias isoladas

Para identificar as bactérias associadas isoladas dos espécimes de esponjas, foram utilizadas duas técnicas, a espectrometria de massa (MALDI-TOF) e o sequenciamento parcial do gene *rrs*.

### 5.2.1 Identificação por sequenciamento do *rrs*

Do total de 161 bactérias isoladas, 42 foram submetidas, até o momento, ao sequenciamento do gene *rrs*. As sequências foram analisadas por meio do alinhamento na plataforma SILVA, todas as cepas foram identificadas com identidade  $\geq 98\%$  e as sequências foram depositadas no banco de dados GenBank. O gênero *Bacillus* foi predominante entre as bactérias isoladas e sequenciadas. Duas amostras foram identificadas como *Photobacterium damsela*e e uma amostra foi afiliada ao gênero *Micrococcus* sp. (Tabela 4).

**Tabela 4** - Afiliação taxonômica por análise das sequências parciais do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA das bactérias isoladas.

Identificação a partir do sequenciamento do 16S rRNA		
Nome da cepa	Afiliação taxonômica	Nº de acesso no GenBank
61 NA 1	<i>Bacillus</i> sp.	KX170704
61 BHI 1:10 1	<i>Bacillus</i> sp.	MG570478
61 R2A 9	<i>Micrococcus</i> sp.	MG570477
68 BHI 1:10 3	<i>Bacillus</i> sp.	MG571235
68 BHI 1:10 8	<i>Bacillus</i> sp.	MG571236
68 BHI 1:10 11	<i>Bacillus</i> sp.	MG571237
68 R2A 2	<i>Bacillus</i> sp.	MG571238
68 R2A 17	<i>Bacillus</i> sp.	MG571239
68 R2A 18	<i>Bacillus</i> sp.	MG571240
68 NA 1	<i>Bacillus</i> sp.	MG571241
72 BHI 6	<i>Photobacterium damsela</i>	KX170714
72 BHI 1:10 2	<i>Bacillus</i> sp.	MG571246
72 BHI 1:10 4	<i>Bacillus</i> sp.	MG571247
72 BHI 1:10 6	<i>Bacillus</i> sp.	MG571248
72 BHI 1:10 7	<i>Bacillus</i> sp.	MG571249
72 BHI 1:10 8	<i>Bacillus</i> sp.	MG571250
72 BHI 1:10 9	<i>Bacillus</i> sp.	MG571251
72 R2A 2	<i>Bacillus</i> sp.	KX170710
72 R2A 3	<i>Bacillus</i> sp.	KX170713
72 R2A 7	<i>Bacillus</i> sp.	KX170712
72 R2A 8	<i>Bacillus</i> sp.	KX170708
72 R2A 9	<i>Bacillus</i> sp.	MG571252
72 R2A 10	<i>Bacillus</i> sp.	KX170707
72 R2A 12	<i>Bacillus</i> sp.	MG571253
72 R2A 16	<i>Bacillus</i> sp.	KX170711
72 R2A 17	<i>Bacillus</i> sp.	KX170709
72 R2A 18	<i>Bacillus</i> sp.	KX170706
72 R2A 20	<i>Bacillus</i> sp.	MG571254
72 R2A21	<i>Bacillus</i> sp.	MG571255
72 R2A 27	<i>Bacillus</i> sp.	MG571256
72 R2A 28	<i>Bacillus</i> sp.	MG571257
72 NA 1	<i>Bacillus</i> sp.	MG571258
72 NA 2	<i>Bacillus</i> sp.	MG571259
72 NA 5	<i>Bacillus</i> sp.	MG571260
72 MA 1	<i>Photobacterium damsela</i>	KX170705
80 BHI 3	<i>Bacillus</i> sp.	MG571242
80 BHI 1:10 7	<i>Bacillus</i> sp.	KX170717
80 R2A 5	<i>Bacillus</i> sp.	KX170715
80 R2A 1	<i>Bacillus</i> sp.	KX170716
80 NA 7	<i>Bacillus</i> sp.	MG571243
80 MA 4	<i>Bacillus</i> sp.	MG5712444
80 MA 7	<i>Bacillus</i> sp.	MG571245

### 5.2.2 Identificação por MALDI-TOF

Do total de bactérias isoladas e mantidas viáveis após a criopreservação, 99 cepas foram identificadas pela espectrometria de massa (MALDI-TOF), com identificação provável para o gênero e até altamente confiável para a espécie, de acordo com a pontuação (*score*) obtida (Tabela 5). Dentre as bactérias identificadas, 19 apresentaram pontuação superior a 2.300, sendo assim, a identidade foi altamente confiável para espécie, sendo 16 amostras afiliadas à espécie *Bacillus cereus* e as demais como *Bacillus megaterium*, *Lactococcus garvieae* e *Enterococcus faecium*. Sessenta e seis bactérias apresentaram pontuação de 2.000 até 2.299, que configura um resultado seguro para gênero e provável para espécie, onde 60 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, 4 ao gênero *Micrococcus* e as duas restantes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*. Com pontuação entre 1.700 e 1.999, que corresponde a uma provável identificação para gênero, foram reconhecidas 14 amostras, 13 pertencentes ao gênero *Bacillus* e uma amostra ao gênero *Micrococcus*. As demais 62 bactérias viáveis, que foram submetidas a análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) apresentaram um *score* que configurava um resultado não confiável.

Os resultados encontrados por espectrometria de massa MALDI-TOF e pelo sequenciamento parcial do gene *rrs* coincidiram. Entretanto, as cepas *P. damselae* 72MA1 e *P. damselae* 72BHI6 não foram analisadas por espectrometria de massa, pois apresentaram problemas de crescimento.

**Tabela 5** - Resultado da identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF

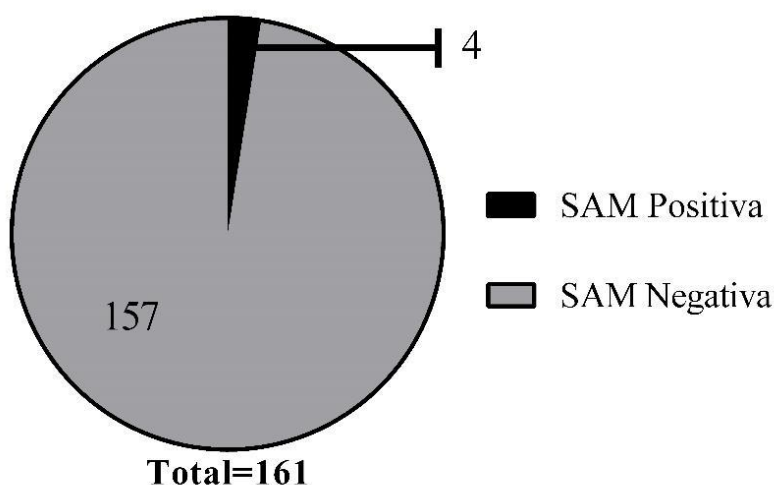
Cepas	Score	Identificação	Cepas	Score	Identificação	Cepas	Score	Identificação
61 BHI 1:10 1	2.111	<i>Bacillus cereus</i>	68 NA 6	2.189	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 28	2.337	<i>Bacillus cereus</i>
61 BHI 1:10 2	1.933	<i>Bacillus circulans</i>	68 NA 8	2.222	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 4	2.279	<i>Bacillus cereus</i>
61 BHI 1:10 3	1.852	<i>Bacillus circulans</i>	68 NA 9	2.128	<i>Bacillus megaterium</i>	72 NA 1	1.968	<i>Bacillus cereus</i>
61 BHI 1:10 5	1.816	<i>Bacillus circulans</i>	68 NA 10	2.229	<i>Bacillus megaterium</i>	72 NA 2	1.977	<i>Bacillus cereus</i>
61 R2A 9	2.273	<i>Micrococcus luteus</i>	68 NA 12	2.248	<i>Bacillus megaterium</i>	72 NA 4	2.351	<i>Bacillus cereus</i>
61 NA 1	1.909	<i>Bacillus cereus</i>	68 NA 15	2.09	<i>Bacillus megaterium</i>	72 NA 5	2.269	<i>Bacillus cereus</i>
61 NA 5	2.102	<i>Bacillus cereus</i>	68 MA 3	1.997	<i>Bacillus soralis</i>	80 BHI 3	2031	<i>Bacillus pumilus</i>
68 BHI 1:10 1	2.062	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 1	2.27	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 6	1.832	<i>Bacillus circulans</i>
68 BHI 1:10 2	2.309	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 2	2.161	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 8	2.287	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 3	2.202	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 3	2.257	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 1	2.24	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 4	2.079	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 4	2.186	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 2	2.195	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 5	2.332	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 5	2.068	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 4	2.365	<i>Lactococcus garvieae</i>
68 BHI 1:10 6	2.325	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 6	2.191	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 5	2.283	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 7	2.093	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 7	2.125	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 6	1.997	<i>Bacillus circulans</i>
68 BHI 1:10 8	2.108	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 8	2.162	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 7	2.208	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 9	2.361	<i>Bacillus cereus</i>	72 BHI 1:10 9	2.042	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 8	2.219	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 10	2.329	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 1	2.265	<i>Micrococcus luteus</i>	80 BHI 1:10 9	2.275	<i>Bacillus cereus</i>
68 BHI 1:10 11	2.097	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 2	2.296	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 10	2.102	<i>Lactococcus garvieae</i>
68 R2A 2	2.214	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 6	2.214	<i>Bacillus cereus</i>	80 BHI 1:10 11	2.46	<i>Enterococcus faecium</i>
68 R2A 3	2.327	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 7	2.36	<i>Bacillus cereus</i>	80 R2A 1	2.259	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 4	2.04	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 8	2.25	<i>Bacillus cereus</i>	80 R2A 2	2.222	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 6	1.975	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 9	2.292	<i>Bacillus cereus</i>	80 R2A 3	2.301	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 7	2.284	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 10	2.28	<i>Bacillus cereus</i>	80 R2A 4	2.096	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 8	2.305	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 11	2.265	<i>Micrococcus luteus</i>	80 R2A 5	2.279	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 17	2.211	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 12	2.31	<i>Bacillus cereus</i>	80 R2A 6	2.349	<i>Bacillus cereus</i>
68 R2A 18	2.242	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 13	2.202	<i>Bacillus cereus</i>	80 NA 1	1.988	<i>Bacillus thuringiensis</i>
68 R2A 20	2.25	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 15	2.311	<i>Bacillus cereus</i>	80 NA 4	2.001	<i>Bacillus circulans</i>
68 R2A 21	2.292	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 17	2.308	<i>Bacillus cereus</i>	80 NA 7	2.106	<i>Bacillus pumilus</i>
68 NA 1	2.214	<i>Bacillus cereus</i>	72 R2A 18	2.169	<i>Bacillus cereus</i>	80 NA 11	2.397	<i>Enterococcus faecium</i>
68 NA 2	2.326	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 20	2.235	<i>Bacillus cereus</i>	80 NA 12	2.353	<i>Bacillus cereus</i>
68 NA 3	1.964	<i>Micrococcus luteus</i>	72 R2A 21	1.94	<i>Bacillus cereus</i>	80 MA 3	2.265	<i>Micrococcus luteus</i>
68 NA 4	2.216	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 23	2.29	<i>Bacillus cereus</i>	80 MA 4	1.916	<i>Bacillus pumilus</i>
68 NA 5	2.272	<i>Bacillus megaterium</i>	72 R2A 27	2.357	<i>Bacillus cereus</i>	80 MA 7	2.091	<i>Bacillus pumilus</i>

Interpretação dos scores - 1.700 até 1.999: Identificação provável para gênero; 2.000 até 2.299: Identificação segura para gênero e provável para espécie; 2.300 até 3.000: Identificação de espécie altamente provável. Células verdes: Identificação confiável para gênero e/ou espécie. Células amarelas: Provável identificação quanto ao gênero.



### 5.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Para avaliar a produção de SAM, 161 cepas isoladas de esponjas da classe Homoscleromorpha foram submetidas ao teste de SAM. Nos testes iniciais de rastreamento de produção de SAM foram utilizadas como bactérias indicadoras *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922. Assim, quatro cepas marinhas, em torno de 2,5% do total dentre as isoladas, foram ativas contra as indicadoras no rastreamento inicial, enquanto que 157 estipes marinhas não apresentaram atividade antimicrobiana nos ensaios realizados (Figura 13).



**Figura 13** – Dados totais do rastreamento inicial de produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias marinhas isoladas contra *S. aureus* e/ou *E. coli*.

As bactérias marinhas que apresentaram atividade inibitória, frente às duas cepas indicadoras, foram 80 BHI 3, 80 NA 7, 80 MA 4 e 80 MA 7 (Tabela 6 e Figura 13). Ambas as bactérias foram isoladas da esponja *Oscarella* sp. (MNRJ 19280), identificadas como gênero *Bacillus*.

**Tabela 6** – Testes iniciais de avaliação da atividade antibacteriana das bactérias isoladas de esponjas

Bactéria indicadoras →		
Bactérias produtoras ↓	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Bacillus</i> sp. 80BHI3	14	20,5
<i>Bacillus</i> sp. 80NA7	33,5	30,5
<i>Bacillus</i> sp. 80MA4	32	22,5
<i>Bacillus</i> sp. 80MA7	38,5	22,5

Valores equivalem a média do valor do diâmetro dos halos (mm). As características fenotípicas das bactérias indicadoras de importância clínica encontram-se na tabela 2.

Para melhor analisar o espectro de ação das bactérias marinhas SAM positivas, foram realizados ensaios para avaliar a atividade inibitória frente a bactérias de importância médica, incluindo cepas multirresistentes (Tabela 7).

**Tabela 7** – Análise do espectro de ação da atividade antimicrobiana das cepas SAM positivas frente a bactérias de importância clínica.

Bactérias produtoras →	80BHI3	80NA7	80MA4	80MA7
Bactérias indicadoras* ↓				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATTC 35984	23	40	38	39
MRSA	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	30	32	25	24
<i>Streptococcus agalactiae</i>	21	23	26	28
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	17	15	16	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	10	11	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	33	36	38
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 1	32	30	33	35
<i>Escherichia coli</i> 2	25	21	18	20
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-

Valores equivalem a média do valor do diâmetro dos halos (mm). O sinal de menos (-) indica ausência de inibição da bactéria indicadora. \*As características fenotípicas das bactérias indicadoras de importância clínica encontram-se na tabela 2.

As quatro bactérias SAM positivas nos testes de rastreamento inicial apresentaram o mesmo perfil de atividade antibacteriana frente às indicadoras clínicas. Dentre as 15 bactérias indicadoras de importância clínica testadas, oito foram inibidas pelas bactérias marinhas. Entre todas as cepas indicadoras utilizadas nos teste, oito eram gram-negativas e sete eram gram-positivas. Excetuando a cepa de MRSA, todas as bactérias gram-positivas foram inibidas pelas cepas SAM positivas. Em contraponto, apenas duas cepas indicadoras gram-negativas foram inibidas, sendo elas pertencentes à mesma espécie, mas com diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos.

As bactérias marinhas produtoras de substância antibacteriana inibiram duas cepas de *Staphylococcus epidermidis*, uma delas é produtora de um polissacarídeo com papel de adesão, cepa conhecida como formadora de biofilme, enquanto a outra cepa é multirresistente aos antimicrobianos, resistente à ampicilina, ciprofloxacina, penicilina e tetraciclina. Além disso, a espécie *Streptococcus pyogenes*, isolado de amostra clínica, teve seu crescimento antagonizado pelas bactérias marinhas isoladas da esponja. Outra bactéria indicadora gram-positiva inibida

foi *Streptococcus agalactiae* resistente à tetraciclina. Duas cepas do gênero *Enterococcus* foram inibidas pelas bactérias SAM positivas, entre elas, *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. A única espécie gram-negativa inibida pelas bactérias SAM positivas foram duas cepas de *E. coli*. Uma das cepas é resistente à ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina, enquanto a outra é resistente à quinolonas (Tabela 7). As demais bactérias indicadoras não foram sensíveis às substâncias produzidas pelas bactérias marinhas isoladas.

A tabela 8 mostra de forma compilada a relação da identificação bacteriana por MALDI-TOF e sequenciamento do gene *rrs* e suas respectivas atividades antimicrobianas contra bactérias de importância médica.

**Tabela 8** - Relação da identificação bacteriana por MALDI-TOF e sequenciamento do 16S rRNA e sua avaliação quanto a produção de substância antimicrobianas.

Cepas	MALDI-TOF	16S rRNA	SAM	Cepas	MALDI-TOF	16S rRNA	SAM
61 BHI 1:10 1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
61 BHI 1:10 2	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 3	ND	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
61 BHI 1:10 3	<i>Bacillus circulans</i>	ND	Negativo	72 R2A 6	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
61 BHI 1:10 5	<i>Bacillus circulans</i>	ND	Negativo	72 R2A 7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
61 R2A 9	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	Negativo	72 R2A 8	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
61 NA 1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 9	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
61 NA 5	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 10	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 1	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 11	<i>Micrococcus luteus</i>	ND	Negativo
68 BHI 1:10 2	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 12	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 3	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 13	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 BHI 1:10 4	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 15	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 BHI 1:10 5	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 16	ND	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 6	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 17	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 7	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 18	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 8	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 20	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 9	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 21	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 BHI 1:10 10	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 23	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 BHI 1:10 11	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 27	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 R2A 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	72 R2A 28	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 R2A 3	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 R2A 4	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 R2A 4	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	72 NA 1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 R2A 6	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 NA 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 R2A 7	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 NA 4	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 R2A 8	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	72 NA 5	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 R2A 17	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 BHI 3	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Positivo
68 R2A 18	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 BHI 6	<i>Bacillus circulans</i>	ND	Negativo

68 R2A 20	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	80 BHI 8	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 R2A 21	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 1	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 NA 1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 BHI 1:10 2	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 NA 2	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 4	<i>Lactococcus garvieae</i>	ND	Negativo
68 NA 3	<i>Micrococcus luteus</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 5	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 NA 4	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 6	<i>Bacillus circulans</i>	ND	Negativo
68 NA 5	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 NA 6	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 8	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 NA 8	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 9	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 NA 9	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 10	<i>Lactococcus garvieae</i>	ND	Negativo
68 NA 10	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 BHI 1:10 11	<i>Enterococcus faecium</i>	ND	Negativo
68 NA 12	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 R2A 1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
68 NA 15	<i>Bacillus megaterium</i>	ND	Negativo	80 R2A 2	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
68 MA 3	<i>Bacillus siralis</i>	ND	Negativo	80 R2A 3	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
72 MA 1	ND	<i>P. damsela</i>	Negativo	80 R2A 4	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
72 BHI 6	ND	<i>P. damsela</i>	Negativo	80 R2A 5	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo
72 BHI 1:10 1	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	80 R2A 6	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 NA 1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 3	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	80 NA 4	<i>Bacillus circulans</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 4	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 NA 7	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Positivo
72 BHI 1:10 5	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo	80 NA 11	<i>Enterococcus faecium</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 6	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 NA 12	<i>Bacillus cereus</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 MA 3	<i>Micrococcus luteus</i>	ND	Negativo
72 BHI 1:10 8	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 MA 4	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Positivo
72 BHI 1:10 9	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Negativo	80 MA 7	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Positivo
72 R2A 1	<i>Micrococcus luteus</i>	ND	Negativo				

ND: Resultado não determinado.

## 6. DISCUSSÃO

O aumento nos relatos de bactérias resistentes a todas as classes de antimicrobianos é um informe muito preocupante, uma vez que reduz o número de alternativas terapêuticas para o tratamento na clínica (WHO, 2014). Em contrapartida, observa-se uma queda na descrição de substâncias que possuam atividade inibitória frente a esses agentes infecciosos. Sendo assim, a busca por produtos naturais bioativos que possam contribuir para o aumento do arsenal terapêutico contra micro-organismos patogênicos se torna cada vez mais necessária (Newman e Cragg, 2012; Blunt *et al.*, 2015, 2017).

Na literatura são descritos diversos relatos de metabólitos bioativos, de interesse farmacológico, a partir de esponjas marinhas. Nesse contexto, se torna crescente o foco na pesquisa sobre esses animais e as substâncias produzidas pelos mesmos (Piel, 2004; Laport, Santos e Muricy, 2009). Algumas evidências apontam para os micro-organismos como produtores ou participantes das vias biossintéticas dos metabólitos bioativos, como: (1) a produção da mesma substância por esponjas distintas taxonomicamente; (2) descrição de moléculas conhecidas por serem sintetizadas exclusivamente por micro-organismos; (3) e concentrações extremamente baixas de metabólitos (Bewley, Holland e Faulkner, 1996; Piel, 2004; Laport, Santos e Muricy, 2009; Khan *et al.*, 2014). A extensa costa brasileira alberga uma grande diversidade de esponjas marinhas (Muricy e Hadju, 2006; Domingos, Lage e Muricy, 2015). Associado a isso, temos os seus consórcios microbianos. Poucos estudos têm investigado a composição das comunidades bacterianas associadas, e o conhecimento sobre metabólitos microbianos com potencial para aplicações biotecnológicas ainda é escasso (Marinho *et al.*, 2009; Santo *et al.*, 2010, 2015; Laport *et al.*, 2016, 2017).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e avaliar produção de substâncias antimicrobianas de parte da comunidade bacteriana cultivável associada a quatro amostras de esponjas da classe Homoscleromorpha, que é a mais nova classe reconhecida dentre o filo Porifera. Estes espécimes de poríferas podem ser encontrados em diferentes habitats, como cavernas subaquáticas totalmente escuras, sendo descritas espécies a 100 metros de profundidade ou em águas costeiras, como as zonas entre marés (Ereskovsky, Ivanišević e Pérez, 2009; Gazave *et al.*, 2012). A classe Homoscleromorpha apresenta outras características peculiares que a difere dos demais membros do filo. A expressão de moléculas comumente encontradas apenas em eumetazoários, como o colágeno do tipo IV, unidos a estudos filogenéticos baseados em diferentes conjuntos de dados moleculares, colocam esses

espécimes de esponjas em uma posição importante para entender a história evolutiva dos metazoários (Borchiellini *et al.*, 2004; Dohrmann *et al.*, 2008 Ereskovsky *et al.*, 2009).

A primeira etapa deste projeto se baseou no isolamento de bactérias associadas aos três morfotipos de *Plakina* e ao espécime de *Oscarella*. Foram selecionadas 174 UFC dos espécimes de esponjas, onde 161 bactérias permaneceram viáveis após a criopreservação. Relativo a isso, é descrito que o meio de cultura influencia diretamente no crescimento bacteriano, principalmente quando se busca recuperar uma maior diversidade de bactérias provenientes de amostras ambientais, sendo por vezes indicado o enriquecimento dos meios de cultura com extratos do próprio ambiente do qual a amostra foi retirada, como por exemplo extrato de esponja, (Zengler *et al.*, 2002; Joint, Mühling, e Querellou, 2010, Montalvo *et al.*, 2014). Entretanto, nem sempre a utilização de extratos é viável, sendo assim, utilizamos meios de cultura ricos para favorecer o crescimento de bactérias heterotróficas de crescimento rápido (BHI, Nutriente) e crescimento lento (BHI diluído 1:10), bactérias marinhas (Marine) e bactérias aquáticas (R2A), tentando abranger uma maior diversidade microbiana, sem selecionar grupos específicos.

Neste trabalho, no total foram isoladas 48 UFC da *Plakina* sp. (MNRJ 19268) e 53 UFC da *Plakina* sp. (MNRJ 19272). Em contraste, os meios semeados com o macerado da amostra *Plakina* sp. cor azul (MNRJ19261) apresentaram menor número de colônias recuperadas, apenas 8 UFC. Sendo observada uma menor variedade morfológica colonial, quando comparada com as demais amostras de *Plakina*. Sendo assim, foram selecionadas um menor número de colônias deste morfotipo de esponja. No entanto, com tais dados não se pode afirmar que o morfotipo de cor azul (MNRJ19261) apresenta uma comunidade microbiana menos abundante do que os demais morfotipos de *Plakina*, pois os meios de cultura utilizados podem ter selecionado apenas determinadas bactérias presente na comunidade microbiana, de acordo com as necessidades metabólicas das mesmas.

No presente projeto, 52 cepas foram selecionadas e isoladas da esponja *Oscarella* sp. (MNRJ19280). Em outro estudo, utilizando 11 amostras de *Oscarella* spp. coletadas na Ilha de Pargos e Ilha Comprida (ambas em Cabo Frio, RJ), Laport e colaboradores (2017) isolaram nos meios de cultura BHI e marine em torno de 32 UFC por indivíduo de esponja. Apenas dois indivíduos de *Oscarella* apresentaram um número de isolados mais discrepante, quando comparado com as demais amostras, um espécime com 15 cepas e outro com 50 cepas, sendo este último valor próximo ao encontrado no presente estudo.

Com o avanço de técnicas independentes de cultivo, como o sequenciamento de nova geração, podemos analisar diferentes aspectos da comunidade bacteriana associada às esponjas.

Assim, é possível determinar os filos presentes, compreender a variação da comunidade intra e interespecífica destes hospedeiros, além de auxiliar na compreensão de como fatores geográficos (distribuição pelo globo, sazonalidade e temperatura) podem interferir na estrutura do microbioma (Schmitt *et al.*, 2012; Hardoim e Costa, 2014; Montalvo *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2016). Entretanto, as técnicas metagenômicas apresentam algumas desvantagens como por exemplo, a não detecção de bactérias presentes a uma concentração inferior a  $10^5$  UFC/mL e a não amplificação de todas as bactérias devido aos iniciadores utilizados (Lagier *et al.*, 2012). Deste modo, o isolamento e cultivo de micro-organismo acoplado aos dados da metagenômica podem abordar uma maior fonte de dados. Um estudo utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo sobre a microbiota intestinal humana realizado por Lagier e colaboradores (2012), observou que a sobreposição em gêneros e espécies detectados entre os dois métodos foi inferior a 10%. Deste modo, a associação dos dados de análises independente de cultivo com os resultados obtidos na caracterização de bactérias cultiváveis, oferecem maior robustez às análises (Lagier *et al.*, 2012; Montalvo *et al.*, 2014; Laport *et al.*, 2016).

O sequenciamento do gene *rrs*, é o sistema de identificação procariótica mais amplamente aceito, sendo utilizado como principal técnica para estudar diversidade procariótica em quase todos os ambientes. Nesse gene são encontradas regiões divergentes e regiões conservadas entre várias bactérias, permitindo que estes micro-organismos sejam categorizados dentro da mesma espécie (Janda e Abbott, 2007; Yang, Wang e Qian, 2016; Martinez-Porchas *et al.*, 2017). Entretanto, de acordo com alguns achados, esta técnica pode apresentar algumas limitações, como os limiares de identidade da sequência do gene *rrs* que não são aplicáveis a múltiplos gêneros e a presença de múltiplos operons de rRNA em um único genoma, podendo levar a variações de nucleotídeos (Ramamany *et al.*, 2014; Rossi-Tamisier *et al.*, 2015). Além disso, esta metodologia é relativamente dispendiosa, além de consumir bastante tempo devido a protocolos complexos, com inúmeras etapas de preparação, desde o preparo da amostra até o resultado final. Com isso, técnicas mais rápidas e práticas para a identificação de micro-organismos vem ganhando espaço, como a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Singhal, *et al.*, 2015).

Resumidamente, a espectrometria de massa MALDI-TOF consiste em uma técnica analítica que identifica a amostra bacteriana de acordo com o espectro de massa específico (relação massa/carga), comparando com um banco de dados composto de espectros pertencentes a cepas de referência, onde as espécies são atribuídas com base na maior porcentagem de similaridade com os perfis espectrais de referência (Seng *et al.*, 2009). Na



microbiologia médica, essa ferramenta tem sido de grande ajuda, demonstrando ser adequada para a identificação de uma gama de espécies, além de subtipos de diferentes espécies e até mesmo na diferenciação de linhagens patogênicas, como no caso de identificação de clones patogênicos de *Listeria monocytogenes* (Jackson *et al.*, 2005; Barbuddhe *et al.*, 2008; Croxatto, Prod'hom, e Greub, 2012). Apesar de inicialmente esta metodologia ser aplicada para microbiologia médica, na bacteriologia ambiental, a espectrometria de massa MALDI-TOF foi utilizada para identificar amostras originadas de lama de esgoto (Ruelle *et al.*, 2004), bactérias que habitam solo contaminado com bifenilpoliclorado (Uhlík *et al.*, 2011), diferenciar espécies bacterianas da família Rhizobiaceae, que estabelecem interações simbióticas ou saprofiticas com plantas (Ferreira *et al.*, 2011) e até mesmo para agrupar bactérias isoladas de diferentes esponjas marinhas de acordo com o “*fingerprint*” dos espectros gerados (Dieckmann *et al.*, 2005). Apesar de vantagens como a velocidade e a acurácia na identificação, o principal limitante da técnica é o banco de dados. Para que ocorra uma melhor identificação, principalmente de bactérias de amostras ambientais, é necessário um aumento nos perfis espectrais nos bancos de dados.

Utilizando a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, das 85 cepas que chegaram em uma identificação confiável quanto ao nível de gênero, 77 foram classificadas como *Bacillus* spp., sendo esse o gênero dominante nas quatro amostras de esponjas. De acordo com as recomendações do software Biotyper (Bruker Daltonics), é indicada a utilização de material fresco para identificação do gênero *Bacillus*, devido a esporulação que pode influenciar na qualidade do espectro obtido e assim afetar os resultados. Além disso, as espécies *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis* estão intimamente relacionados, pertencendo ao grupo *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus sensu lato*) (Drobniewski, 1993; Jiménez *et al.*, 2013). Deste modo, essas espécies podem gerar espectros parecidos, principalmente os espectros de *B. cereus* e *B. anthracis*, que apresentam espectros muito semelhantes. Vale salientar que a espécie *B. anthracis* não está incluída no banco de dados do software Biotyper utilizado neste estudo. O resultado encontrado pelo sequenciamento parcial do gene *rrs* corroborou com os achados nas análises por espectrometria de massa, classificando 39 bactérias associadas às esponjas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, entretanto, não foi possível obter classificação de espécies.

Do total de 52 UFC isoladas da esponja *Oscarella* sp. (MNRJ 19280), 22 amostras foram identificadas como *Bacillus* spp. pela espectrometria de massa, do qual 4 foram confirmados com o resultado do sequenciamento do 16S rRNA. Entre 337 bactérias isoladas por Laport e colaboradores (2017), de 11 espécimes de *Oscarella*, foi observada o predomínio das classes

Bacilli e Gammaproteobacteria, se dividindo em 12 gêneros bacterianos diferentes, entre eles foram encontradas oito amostras de *Bacillus*, isoladas de 4 dos 8 espécimes de esponjas estudados, sendo ausente na água do mar circundante. Além disso, no mesmo trabalho, foi isolado de uma das amostras de *Oscarella* uma cepa pertencente ao gênero *Enterococcus*, sendo ausente na água do mar circundante. Enquanto isso, o gênero *Lactococcus*, foi isolado a partir da água circundante e foi ausente nas amostras de esponjas. No presente estudo foram isoladas da esponja *Oscarella* sp. (MNRJ 19280) duas UFC com identificação de espécie altamente provável para *Enterococcus faecium*, em concordância com Laport e colaboradores (2017). Em contrapartida, no presente trabalho foi isolada uma cepa *Lactococcus garvieae* (identificação confiável quanto à espécie) da amostra de *Oscarella* sp.. Esta espécie é conhecida por ser patógeno de peixes marinhos (Vendrell *et al.*, 2006), e foi descrita poucas vezes como componente da microbiota de seres vivos. Como exemplo dessa escassa relação ecológica temos a descrição desse micro-organismo sendo encontrado na microbiota de moluscos marinhos (Lee *et al.*, 2016) e crustáceos marinhos (Kim *et al.*, 2017). A presença dessa bactéria na esponja *Oscarella* sp. (MNRJ 19280), junto com a presença na água do mar circundante e ausência na microbiota das amostras de estudos de Laport e colaboradores (2017) dão espaço para análise de algumas hipóteses. Essa espécie pode fazer parte de uma microbiota transiente, visto que apesar das esponjas apresentarem um microbioma “core” (que pode ser considerado, de um certo modo, esponja-específico) que é relativamente estável ao longo da vida do indivíduo, fatores ambientais podem levar a mudanças dinâmicas na estrutura da comunidade (Hardoim e Costa, 2014; Thomas *et al.*, 2016; Webster e Thomas, 2016). Além disso, mesmo componentes da comunidade microbiana, considerado esponja-específico, podem ser encontrados na água do mar circundante e sedimentos, mas em uma menor proporção (Thomas *et al.*, 2016; Webster e Thomas, 2016).

No ambiente marinho, as esponjas, de modo geral, se destacam devido à diversidade microbiana abrigadas em sua comunidade (Thomas *et al.*, 2016). Os micro-organismos, por sua vez, proporcionam uma ampla gama de características metabólicas e bioquímicas que são utilizadas pelas esponjas como defesa frente a predadores e patógenos, na competição intra e interespecífica e na homeostase da própria comunidade microbiana (Hillman e Goodrich-Blair, 2016; Satheesh, Ba-akdah e Al-Sofyani, 2016; Laport *et al.*, 2016, 2017; Esteves *et al.*, 2017). Tendo em vista esse panorama, diversos trabalhos realizados buscam encontrar metabólitos bioativos a partir de bactérias associadas às esponjas marinhas devido a notória diversidade de moléculas por elas produzidas (Marinho *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010, 2015; Ye *et al.*, 2015;

Laport *et al.*, 2016, 2017). Sendo assim, o presente estudo analisou a atividade antimicrobiana das bactérias isoladas de três morfotipos de *Plakina* spp. E de uma espécie de *Oscarella*.

Entre 174 bactérias isoladas, quatro UFC foram positivas no teste de produção de substância antimicrobiana (SAM positivas) pelo método de difusão em meio sólido, descrito anteriormente por Marinho e colaboradores (2009). Na identificação por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF as cepas 80 BHI 3, 80 NA 7, 80 MA 4 e 80 MA 7 foram identificadas com *Bacillus pumilus*. Entretanto, o *score* apresentado para 80 BHI 3, 80 NA 7 e 80 MA 7 é seguro para gênero e provável para espécie, enquanto que a identificação obtida para a cepa 80 MA 3 é provável para gênero. Após o sequenciamento parcial do gene *rrs* foi confirmado que as quatro bactérias SAM positivas foram afiliadas taxonomicamente ao gênero *Bacillus*, com identidade  $\geq 98\%$ .

Existem diversos relatos na literatura a cerca da produção de substâncias antibacterianas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (Lawrance *et al.*, 2014; Mohan, Thangappanpillai e Ramasamy, 2016, Avcı *et al.*, 2017 Vazquez-Mendoza *et al.*, 2017). Isolada da esponja *Dysidea fragilis* (Classe Demospongiae), a cepa *Bacillus* SEB32 apresentou atividade antibacteriana frente a patógenos virulentos de peixes marinhos, como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter brackii*. Por meio de análises cromatográficas e por espectrometria, a molécula ativa foi isolada e identificada como a substância Hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, que contém o grupamento pirrol na sua estrutura química (Mohan, Thangappanpillai e Ramasamy, 2016). Lawrence e colaboradores (2014), descreveram um eficiente surfactante lipopeptídico com potencial antimicrobiano. A molécula foi isolada da cepa *Bacillus licheniformis* NIOT-AMKV06, bactéria isolada da esponja *Acanthella* sp. (Demospongiae) coletada em Port Blair, Índia. Utilizando um ensaio de difusão em ágar com o surfactante extraído e purificado, a eficácia antibacteriana da molécula frente a 12 patógenos humanos foi analisada. A substância inibiu o crescimento das bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *M. luteus*, e as gram-negativas *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*. Não houve inibição das bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*. No presente trabalho, apenas uma entre oito indicadoras gram-positivas não foi inibida pelas quatro cepas de bactérias associadas. Em contrapartida ao resultado encontrado por Lawrence e colaboradores (2014), onde a bactéria *E. coli* não foi inibida, no presente estudo tanto *E. coli* ATCC 25922, utilizada na triagem, quanto as duas cepas indicadoras de importância clínica *E. coli* 1 (resistente à ampicilina, cloranfenicol,

sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina) e *E. coli* 2 (resistente à quinolonas) tiveram seu crescimento inibido.

Poucos estudos abordam o potencial antibacteriano das bactérias associadas a esponjas do Rio de Janeiro, entretanto, os achados são muito promissores (Marinho *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010, 2015; Laport *et al.*, 2016, 2017). No presente estudo, aproximadamente 2,5% do total de isolados bacterianos foram SAM positivos, este resultado é inferior aos encontrados em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (Marinho *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Laport *et al.*, 2017). No estudo de Laport e colaboradores, (2017), do total de 85 bactérias submetidas ao teste de SAM, 31,7% foram positivas. O resultado corroborou ao encontrado por Marinho e colaboradores (2009), onde foi observada uma porcentagem de 22% (7 de 32 isolados) de bactérias produtoras de substâncias antibacterianas. Enquanto que Santos e colaboradores (2010), demonstraram que 9% (12) das 139 UFC testadas foram SAM positivas. Apesar da menor abundância de bactérias SAM positivas, quando comparado aos estudos anteriores, o predomínio de atividade inibitória frente a bactérias indicadoras gram-positivas foi congruente (Santos *et al.*, 2010, Laport *et al.*, 2017). A menor frequência de atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-negativas já era esperada. A menor susceptibilidade em bactérias gram-negativas pode, estar ligada à presença de membrana externa e lipopolissacarídeo, que unidos atuam como uma barreira eficiente contra moléculas hidrofóbicas e lipofílicas (Snyder e McIntosh, 2000).

O relatório da OMS de 2014 volta os nossos olhos a problemática dos micro-organismos que representam uma grande ameaça mundial nas próximas décadas devido à resistência aos antimicrobianos, sendo essencial a busca por substâncias bioativas frente a esses patógenos. No presente trabalho, tentamos avaliar se a substância produzida por cada bactéria SAM positiva isolada era capaz de inibir o crescimento de micro-organismos multirresistentes, como a cepa de *Citrobacter freundii*, pertencentes a família Enterobacteriaceae, produtoras de ESBL e resistente aos antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e quinolonas. Entretanto, o resultado foi negativo. Em oposição a esse fato, o resultado positivo frente as bactérias indicadoras *E. faecium* ATCC 19434 e *E. faecalis* resistente à vancomicina podem trazer uma boa estimativa para o teste das bactérias marinhas frente a *E. faecium* resistente à vancomicina, um dos micro-organismos listados pela OMS. Futuramente, outras cepas indicadoras, presentes na lista da OMS podem ser testadas, como as bactérias fastidiosas *Neisseria gonorrhoeae* (resistente à cefalosporinas e fluoroquinolonas) e *Streptococcus pneumoniae* (com resistência à penicilina).

## 7. CONCLUSÃO

- A amostra com maior número de bactérias isoladas foi *Plakina* sp. cor laranja (MNRJ19272), seguida pela amostra de *Oscarella* sp. (MNRJ19280), *Plakina* sp. cor creme (MNRJ19268) e *Plakina* sp. cor azul (MNRJ19261).
- Dentre os meios de cultura usados, a frequência relativa do número de bactérias isoladas foi bem próxima, com exceção do meio Marine.
- O gênero *Bacillus* foi predominantemente isolado das amostras de esponjas, nas condições de culturas utilizadas.
- A identificação bacteriana por meio da análise das sequências parciais do gene *rrs* e da espectrometria de massa MALDI-TOF foi congruente.
- Entre todas as bactérias isoladas, quatro foram consideradas SAM positivas, sendo todas isoladas da amostra *Oscarella* sp. (MNRJ19280) e pertencentes ao gênero *Bacillus*.
- As bactérias marinhas SAM positivas inibiram o crescimento de bactérias de interesse clínico, incluindo cepas resistentes, demonstrado o seu potencial antimicrobiano para estudos futuros.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avci, A., Çağrı-Mehmetoğlu, A., e Arslan, D. (2017). Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella Typhimurium*. *LWT-Food Sci. and Technol.*, 80, 265-270.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., e Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5402-5407.
- Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuar. Coast Shelf Sci.*, 79, 341-353.
- Bewley, C. A., Holland, N. D., e Faulkner, D. J. (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Cell. Mol. Life Sci.*, 52, 716-722.
- Blanquer, A., Uriz, M.J., Cebrian, E., e Galand, P.E. (2016). Snapshot of a Bacterial Microbiome Shift during the Early Symptoms of a Massive Sponge Die-Off in the Western Mediterranean. *Front. Microbiol.*, 7.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., e Prinsep, M. R. (2015). *Nat. Prod. Rep. Natural Product Reports*, 32, 116-211.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H., e Prinsep, M.R. (2017). *Nat. Prod. Rep. Natural Product Reports*, 34, 235-294.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., e Boury-Esnault, N. (2004). Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32, 823-837.
- Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A., Bézac, C., e Tokina, D. (2003). Larval development in the Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebr. Bio.*, 122, 187-202.
- Boury-Esnault, N., Lavrov, D. V., Ruiz, C. A., e Pérez, T. (2013). The integrative taxonomic approach applied to Porifera: a case study of the Homoscleromorpha. *Integr. Comp. Biol.*, 53, 416-427.
- Boury-Esnault, N., Muricy, G., Gallissian, M. F., e Vacelet, J. (1995). Sponges without skeleton: a new Mediterranean genus of Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Ophelia*, 43, 25-43.
- Boute, N., Exposito, J.-Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K. e Garrone, R. (1996). Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol Cell*. 88: 37-44.
- Brusca, R. C. e Brusca, G. J. (1990). *Invertebrates*. Sinauer Associates, 181-210.
- Cavalcanti, M. D. (2016). Isolamento e identificação de bactérias anaeróbias estritas de esponjas marinhas do gênero *Plakina*. Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 50f.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiol. Rev.*, 36, 380-407.
- Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A. G., e Wörheide, G. (2008). Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida). *Syst. Biol.*, 57, 388-405.
- Domingos, C., Lage, A., e Muricy, G. (2016). Overview of the biodiversity and distribution of the Class Homoscleromorpha in the Tropical Western Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 96, 379-389.
- Doyle, M. P., Loneragan, G. H., Scott, H. M., e Singer, R. S. (2013). Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Compr. rev. food sci. food saf.*, 12, 234-248.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6, 324-338.
- Ereskovsky, A. V. (2006). A new species of *Oscarella* (Demospongiae: Plakinidae) from the Western Sea of Japan. *Zootaxa*, 1376, 37-51.
- Ereskovsky, A. V., Borchiellini, C., Gazave, E., Ivanisevic, J., Lapebie, P., Perez, T., Renard, E., e Vacelet, J. (2009). The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *BioEssays*, 31, 89-97.
- Ereskovsky, A. V., Borisenko, I. E., Lapébie, P., Gazave, E., Tokina, D. B., e Borchiellini, C. (2015). *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha, Porifera) regeneration: epithelial morphogenesis and metaplasia. *PLoS one*, 10, e0134566.

- Ereskovsky, A. V., e Tokina, D. B. (2007). Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Mar. Biol.*, 151, 425-434.
- Ereskovsky, A. V., Ivanisevic, J., e Pérez, T. (2009). Overview on the Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean. In *Proceedings of the 1st Symposium on the coralligenous and other calcareous bioconcretions of the Mediterranean Sea, Tabarka* (pp. 15-16).
- Ereskovsky, A. V., Lavrov, D. V., e Willenz, P. (2014). Five new species of Homoscleromorpha (Porifera) from the Caribbean Sea and re-description of *Plakina jamaicensis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 94, 285-307.
- Esteves, A. I., Cullen, A., e Thomas, T. (2017). Competitive interactions between sponge-associated bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 93.
- Exposito, J. Y., Cluzel, C., Garrone, R., e Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *Anat. Rec.*, 268, 302-316.
- Fan, L., Reynolds, D., Liu, M., Stark, M., Kjelleberg, S., Webster, N. S., e Thomas, T. (2012). Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 109, E1878-E1887.
- Fischbach, M. A., e Segre, J. A. (2016). Signaling in host-associated microbial communities. *Cell*, 164, 1288-1300.
- Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P., e Borchiellini, C. (2012). No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia*, 687, 3-10.
- Gazave, E., Lapébie, P., Renard, E., Vacelet, J., Rocher, C., Ereskovsky, A. V., Lavrov, D. V., e Borchiellini, C. (2010). Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of homoscleromorph sponges (Porifera, Homoscleromorpha). *PloS one*, 5, e14290.
- Gazave, E., Lavrov, D. V., Cabrol, J., Renard, E., Rocher, C., Vacelet, J., Adamska, M., Borchiellini, C., e Ereskovsky, A. V. (2013). Systematics and molecular phylogeny of the family Oscarellidae (Homoscleromorpha) with description of two new *Oscarella* species. *PloS one*, 8, e63976.
- Gloeckner, V., Hentschel, U., Ereskovsky, A. V., e Schmitt, S. (2013). Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). *Mar. Biol.*, 160, 781-791.
- Gloeckner, V., Wehr, M., Moitinho-Silva, L., Gemert, C., Schupp, P., Pawlik, J. R., Lindquist, N. L., Erpenbeck, D., Wörheide, G., e Hentschel, U. (2014). The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscopical survey of 56 sponge species. *Biol. Bull.*, 227, 78-88.
- Hajdu, E., Peixinho, S., & Fernandez, J. C. (2011). *Esponjas marinhas da Bahia: guia de campo e laboratório*. Museu Nacional.
- Hardoim, C.C., e Costa, R. (2014). Temporal dynamics of prokaryotic communities in the marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. *Mol. ecol.*, 23, 3097-3112.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S.M. e Taylor, M.W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 641–654.
- Hentschel, U., Usher, K. M., e Taylor, M. W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 55, 167-177.
- Hillman, K., e Goodrich-Blair, H. (2016). Are you my symbiont? Microbial polymorphic toxins and antimicrobial compounds as honest signals of beneficial symbiotic defensive traits. *Curr. Opin. Microbio.*, 31, 184-190.
- Hooper, J. N., e Van Soest, R. W. (2002). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges*. In *Systema Porifera* (pp. 1-7). Springer US.
- Humbert-David, N., e Garrone, R. (1993). A six-armed, tenascin-like protein extracted from the Porifera *Oscarella tuberculata* (Homosclerophorida). *Eur. J. Biochem.*, 216, 255-260.
- Igrejas, G., Capelo, J. L., Gonçalves, A., e Poeta, P. (Eds.). (2017). *Surveying Antimicrobial Resistance: Approaches, Issues, and Challenges to Overcome*. Frontiers Media SA.
- Jackson, K.A., Edwards-Jones, V., Sutton, C.W., e Fox, A.J. (2005). Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods*; 62: 273–284.

- Janda, J.M., e Abbott, S.L., (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer P., Kolstø A. B., Ramón D., Martínez J. F., Codoñer F. M, e Rosselló-Móra R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36, 383-391.
- Jinks, T., Lee, N., Sharland, M., Rex, J., Gertler, N., Diver, M., Jones, I., Jones, K., Mathewson, S., Chiara, F., e Farrar, J. (2016). A time for action: antimicrobial resistance needs global response. *Bull. World Health Organ.*, 94, 558-559.
- Joint, I., Mühlhling, M., e Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria—an essential prerequisite for biodiscovery. *Microb Biotechnol*, 3, 564-575.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica—Texto e Atlas*, 4, 70.
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J. Y., e Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?. *Int. J. Antimicrob. Agent*, 42, 379-383.
- Khan, S. T., Musarrat, J., Alkhedhairy, A. A., e Kazuo, S. (2014). Diversity of bacteria and polyketide synthase associated with marine sponge *Haliclona* sp. *Annals of Microbiology*, 64, 199-207.
- Kim, S., Lee, M. J., Lee, J. J., Choi, S. H., & Kim, B. S. (2017). Analysis of microbiota of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) in South Korea to identify risk markers for foodborne illness. *LWT-Food Sci. and Technol.*, 86, 483-491.
- Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Fournous G., G. Gimenez G., Maraninchi M., Koonin E. V., La-Scola B., Raoult D. e Trape, J. F. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 1185-1193.
- Laport, M. S., Bauwens, M., de Oliveira Nunes, S., Willenz, P., George, I., e Muricy, G. (2017). Culturable bacterial communities associated to Brazilian *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha) and their antagonistic interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 489-499.
- Laport, M. S., Santos, O. C. S., e Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Curr. Pharma. Biotechnol.*, 10, 86-105.
- Laport, M. S., Santos-Gandelman, J. F., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., e George, I. (2016). Antagonistic interactions among bacteria isolated from either the same or from different sponges native to the Brazilian coast. *J Mar Sci Res Dev*, 6, 185.
- Lawrance, A., Balakrishnan, M., Joseph, T. C., Sukumaran, D. P., Valsalan, V. N., Gopal, D., e Ramalingam, K. (2014). Functional and molecular characterization of a lipopeptide surfactant from the marine sponge-associated eubacteria *Bacillus licheniformis* NIOT-AMKV06 of Andaman and Nicobar Islands, India. *Mar. poll. Bull.*, 82, 76-85.
- Lee, M. J., Lee, J. J., Chung, H. Y., Choi, S. H., & Kim, B. S. (2016). Analysis of microbiota on abalone (*Haliotis discus hannai*) in South Korea for improved product management. *Int. J. Food Microbiol.*, 234, 45-52.
- Lee, Y. K., Lee, J. H., e Lee, H. K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbiol. Seoul*, 39, 254-264.
- Levi, C., e Levi, P. (1965). Populations bacteriennes dans les éponges. *J. de Microsc. (Paris)*, 4, 151.
- Lopes, D. A., Bravo, A., e Hajdu, E. (2012). New carnivorous sponges (Cladorhizidae: Poecilosclerida: Demospongiae) from off Diego Ramírez Archipelago (south Chile), with comments on taxonomy and biogeography of the family. *Invertebr. Syst.*, 25, 407-443.
- Maldonado, M., Ribes, M., e van Duyl, F. C. (2012). 3 Nutrient Fluxes Through Sponges: Biology, Budgets, and Ecological Implications. *Advances in marine biology*, 62, 113.
- Maloof, A. C., Rose, C. V., Beach, R., Samuels, B. M., Calmet, C. C., Erwin, D. H., Poirier, G. R., Yao, N., e Simons, F. J. (2010). Possible animal-body fossils in pre-Marinoan limestones from South Australia. *Nat Geosci*, 3, 653-659.
- Marconi, R., e Pronzato R. (2016). How to survive and persist in temporary freshwater? Adaptive traits of sponges (Porifera: Spongillida): A review. *Hydrobiol.* 782, 11.



- Marinho, P.R., Moreira, A.P.B., Pellegrino, F.L.P.C., Muricy, G., Bastos, M.D.C.D.F., Santos, K.R.N.D., Giambiagi-deMarval e M., e Laport, M.S. (2009). Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 678-682.
- Martinez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Suarez, L. E. O., e Vargas-Albores, F., (2017). How conserved are the conserved 16S-rRNA regions?. *PeerJ*, 5, e3036.
- Mioso, R., Marante, F. J. T., Bezerra, R. D. S., Borges, F. V. P., Santos, B. V., e Laguna, I. H. B. D. (2017). Cytotoxic Compounds Derived from Marine Sponges. A Review (2010–2012). *Molecules*, 22, 208.
- Mohan, G., Thangappanpillai, A. K. T. e Ramasamy, B. (2016). Antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of sponge endosymbiotic bacteria, *Bacillus* sp. at Agatti Island, Lakshadweep Archipelago. *Biotechnol. Rep.*, 11, 44-52.
- Moitinho-Silva, L., Díez-Vives, C., Batani, G., Esteves, A. I., Jahn, M. T., e Thomas, T. (2017). Integrated metabolism in sponge–microbe symbiosis revealed by genome-centered metatranscriptomics. *The ISME J.* 1–16.
- Montalvo, N.F., Davis, J., Vicente, J., Pittiglio, R., Ravel, J. e Hill, R.T. (2014) Integration of Culture-Based and Molecular Analysis of a Complex Sponge-Associated Bacterial Community. *PLoS ONE* 9(3): e90517. doi:10.1371/journal.pone.0090517.
- Montaser, R., e Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future*, 3, 1475-1489.
- Muricy G. (2017). Porifera in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/6>>. Acesso em: 22 Maio. 2017
- Muricy G. e Hajdu E. (2006) Porifera Brasilis: Guia de Identificação das Esponjas Mais Comuns do Sudeste do Brasil. *Eclesiarte*, Rio de Janeiro.
- Muricy G., Lopes D.A., Hajdu E., Carvalho M.S., Moraes F.C., Klautau M., Menegola C. e Pinheiro U. (2011). Catalogue of Brazilian Porifera. Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Muricy, G. e Pearse, J.S. (2004). A new species of *Oscarella* (Demospongiae: Plakinidae) from California. *roc. Calif. Acad. Sci.*, 55, 598-612, 600-605.
- Muricy, G., Boury-Esnault, N., Bézac, C. e Vacelet, J. (1996). Cytological evidence for cryptic speciation in Mediterranean *Oscarella* species (Porifera, Homoscleromorpha). *Can. J. Zool.*, 74, 881-896.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75, 311-335.
- Nichols, S. e Wörheide, G. (2005). Sponges: New Views of Old Animals. *Integr Comp Biol.* 45, 333-334.
- Pansini M., Manconi R. e Pronzato R. (2011) Porifera I. Calcarea, Demospongiae (partim), Hexactinellida, Homoscleromorpha. *Fauna d'Italia.* 46, 554.
- Pérez, T., Ivanisevic, J., Dubois, M., Pedel, L., Thomas, O.P., Tokina, D. e Ereskovsky, A.V. (2011). *Oscarella balibalo*, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology. *Mar. Ecol. Evol. Persp.*, 32, 174–187.
- Piel, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 519-538.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S; Bolzani, V. Da S; Lopes, N.P. e Epifânio, R. A. (2002). Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, 25, 45-61.
- Proksch, P.; Edrada, R. A. e Ebel, R. (2002). Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 125-134.
- Pruesse, E., Peplies, J. e Glöckner, F.O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28, 1823-1829.
- Radjasa, O.K.; Martens, T.; Grossart, H.; Brinkhoff, T.; Sabdono, A. e Simmon, M. (2007). Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp.. *J Biol Sci.* 2, 239–246.
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J. C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., e Fournier, P. E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 384-391.

- Reimer, A., Blohm, A., Quack, T., Greveling, C. G., Kozjak-Pavlovic, V., Rudel, T., Hentschel, U. e Abdelmohsen, U. R. (2015). Inhibitory activities of the marine streptomycete-derived compound SF2446A2 against *Chlamydia trachomatis* and *Schistosoma mansoni*. *J. Antibiot.*, 68, 674-679.
- Reitner, J., e Wörheide, G. (2002). Non-lithistid fossil Demospongiae – origins of their palaeobiodiversity and highlights in history of preservation. In *Systema Porifera*, Springer US, 52-68.
- Ribes, M., Dziallas, C., Coma, R., e Riemann, L. (2015). Microbial diversity and putative diazotrophy in high- and low-microbial-abundance Mediterranean sponges. *Applied Environ. Microbiol.*, 81, 5683-5693.
- Rossi-Tamisier, M., Benamar, S., Raoult, D., e Fournier, P. E. (2015). Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1929-1934.
- Ruiz, C., Ivanišević, J., Chevaldonné, P., Ereskovsky, A. V., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Thomas, O. P. e Pérez, T. (2015). Integrative taxonomic description of *Plakina kanaky*, a new polychromatic sponge species from New Caledonia (Porifera: Homoscleromorpha). *Mar. Ecol.*, 36, 1129-1143.
- Ruiz, C., Muricy, G., Lage, A., Domingos, C., Chenesseau, S., e Pérez, T. (2017). Descriptions of new sponge species and genus, including aspiculate Plakinidae, overturn the Homoscleromorpha classification. *Zool. J. Linn. Soc.*, 179, 707-724.
- Ruppert, E.E. e Barnes, R.D. (1994). *Invertebrate zoology*, 6th ed., Harcourt Brace College Publishers, 928.
- Sambrook, J., e Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1-3.
- Santos, O.C.S., Pontes, P., Santos, J.F.M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M. e Laport, M.S. (2010). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Res Microbiol.*, 161, 604-612.
- Santos, O.C.S., Soares, A.R., Machado, F.L.S., Romanos, M.T.V., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M. e Laport, M.S. (2015). Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. *Lett. Appl. Microbiol.*, 60, 140-147.
- Santos-Gandelman, J.F., Giambiagi-deMarval, M., Oelemann, W.M.R. e Laport, M.S. (2014a). Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 15, 143-155.
- Santos-Gandelman, J.F., Cruz, K., Crane, S., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., Barkay, T. e Laport, M.S. (2014b). Potential application in mercury bioremediation of a marine sponge-isolated *Bacillus cereus* strain Pj1. *Curr. microbial.*, 69, 374-380.
- Santos-Gandelman, J.F., Giambiagi-deMarval, M., Muricy, G., Barkay, T., e Laport, M.S. (2014c). Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 585-590.
- Satheesh, S., Ba-akdah, M.A., e Al-Sofyani, A.A. (2016). Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms – A review. *Electron. J. Biotechnol.*, 21, 26-35.
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., e Webster, N. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6, 564-576.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., e Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49, 543-551.
- Simister, R.L., Deines, P., Botté, E.S., Webster, N.S., e Taylor, M.W. (2012). Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ Microbiol.*, 14, 517-524.
- Simpson, T.L. (1984). *The cell biology of sponges*, 1th ed., Springer-Verlag, New York, pp 42-69 e 681.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., e Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Skov R., e Monnet D. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill*, 21, pii=30155.
- Snyder, D. S., e McIntosh, T. J. (2000). The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. *Biochemistry*, 39, 11777-11787.

- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., e Wagner, M. (2007). Sponge associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71, 295-347.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J.R., Easson, C., Astudillo-García, C., Olson, J.B., Erwin, P.M., López-Legentil, S., Luter, H., Chaves-Fonnegra, A., Costa, R., Schupp, P.J., Steindler, L., Erpenbeck, D., Gilbert, J., Knight, R., Ackermann, G., Lopez, J.V., Taylor, M.W., Thacker, R.W, Montoya, J.M., Hentschel, U. e Webster, N.S (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, 7.
- Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M.Z., Yung, P.Y., Lewis, M., Halpern, A., Heidelberg, K.B., Egan, S., Steinberg, P.D., e Kjelleberg, S. (2010). Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *The ISME journal*, 4, 1557-1567.
- Vacelet, J. e Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 30, 301–314.
- Vacelet, J., e Boury-Esnault, N. (1995). Carnivorous sponges. *Nature*, 373, 333
- Vacelet, J., e Duport, E. (2004). Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). *Zoomorphology*, 123, 179-190.
- van Soest, R. W. M; Boury-Esnault, N.; Hooper, J. N. A.; Rützler, K.; de Voogd, N. J.; Alvarez, B.; Hajdu, E.; Pisera, A. B.; Manconi, R.; Schönberg, C.; Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L.; Rios, P.; Downey, R. (2017). World Porifera database. Disponível em <http://www.marinespecies.org/porifera> Acessado em 2017-11-10
- van Soest, R.W, Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N.J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. e Hooper, J. N. (2012). Global diversity of sponges (Porifera), *PLoS ONE*, 7, e35105.
- Vazquez-Mendoza P., Elghandour M. M. M., Alaba P. A., Sánchez-Aparicio P., Alonso-Fresán, MariÚxí, Barbabosa-Pliego A. e Salem A. Z. M. (2017). Antimicrobial and bactericidal impacts of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 on fecal shedding of pathogenic bacteria in dairy calves and adult dogs, *Microbial Pathogenesis*. Data de aceitação: 23 de novembro de 2017.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzueta, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 177-198.
- Vishnyakov, A. E., e Ereskovsky, A. V. (2009). Bacterial symbionts as an additional cytological marker for identification of sponges without a skeleton. *Mar. Biol.*, 156, 1625-1632.
- Webster, N. S. e Thomas, T. (2016). The Sponge Hologenome. *mBio*, 7, e00135-16.
- Webster, N. S., e Taylor, M.W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ. Microbiol.*, 14, 335-346.
- Wehr, M., Steinert, M., e Hentschel, U. (2007). Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial ecology*, 53, 355-365.
- WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
- Wilkinson C. R. (1971). Microbial Associations in Sponges. I. Ecology, Physiology and Microbial Populations of Coral Reef Sponges. *Mar. Biol.*, 49, 161-167.
- Wilkinson, C. R. (1978). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.*, 49, 177-185.
- Williams, P. G. (2009). Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.*, 27, 45–52.
- Willyard, C. (2017). Drug-resistant bacteria ranked. *Nature*, 543, 15.
- Wulff J. (2012). Ecological interactions and the distribution, abundance, and diversity of sponges. *Adv Mar Biol.*, 61, 273–344.

Yang B., Wang Y. e Qian P.Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17:135

Ye, L., Santos-Gandelman, J.F., Hardoim, C.C., George, I., Cornelis, P. e Laport, M.S. (2015). Antibacterial activity and mutagenesis of sponge-associated *Pseudomonas fluorescens* H41. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 117-126.

Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., & Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 15681-15686.

Zhang, F., Blasiak, L. C., Karolin, J. O., Powell, R. J., Geddes, C. D., e Hill, R. T. (2015). Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 112, 4381-4386.

Zilber-Rosenberg, I. e Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 5, 723–735.