

LAENNE GOMES DE MEDEIROS

Micro-organismos de Recifes de Coral de Oceano Profundo: Isolamento, Identificação e Filogenia



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
DEZEMBRO/2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, sob orientação da Professora Flávia Lima do Carmo e co-orientação da Doutora Caren Leite Spindola Vilela.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

M488m Medeiros, Laenne Gomes de
Micro-organismos de Recifes de Coral de Oceano
Profundo: Isolamento, Identificação e Filogenia /
Laenne Gomes de Medeiros. -- Rio de Janeiro, 2022.
95 f.

Orientadora: Flávia Lima do Carmo.
Coorientadora: Caren Leite Spindola Vilela.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. oceano profundo. 2. isolamento microbiano. 3.
filogenia. 4. biologia molecular. I. Carmo, Flávia
Lima do, orient. II. Vilela, Caren Leite Spindola,
coorient. III. Título.

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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Laenne Gomes de Medeiros**
 DRE: 119061527

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Maria Mazotto (Presidente)
 Prof. Henrique Fragoso dos Santos
 Prof. Fabio Vieira de Araujo
 Prof. Diogo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Micro-organismos de Recifes de Coral de Oceano Profundo: Isolamento, Identificação e Filogenia”**

Local: **Anfiteatro do IMPPG / CCS / UFRJ**
 Data e hora de início: **15 de dezembro de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2022.

NOTA

10,0
10,0
10,0

Banca Examinadora:

Ana Maria M de Almeida
 Profa. Ana Maria Mazotto
Henrique F. dos Santos
 Prof. Henrique Fragoso dos Santos
Fabio Vieira de Araujo
 Prof. Fabio Vieira de Araujo
Diogo Jurelevicius
 Prof. Diogo Jurelevicius

Aluno:

Laenne Gomes de Medeiros
 Laenne Gomes de Medeiros

Orientador:

Flávia Lima do Carmo / Caren Leite Spindola Vilela
 Profa. Flávia Lima do Carmo / Coorientador: Dra. Caren Leite Spindola Vilela

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus irmãos, Arthur Brenno e Giovanna.
Para que nunca desistam de seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me mantido com fé ao longo desses 4 anos que foram extremamente desafiantes para mim.

Agradeço à minha família, aos meus pais por terem me ensinado a ser uma boa pessoa sempre, e a sua maneira, por terem me apoiado nessa trajetória; e aos meus irmãos, por terem sido combustível para que eu fosse trás dos meus sonhos para mostrá-los que independente de onde viemos, com garra, perseverança e fé, podemos chegar a qualquer lugar que queremos.

Agradeço aos meus avós por terem me levado pela primeira vez na universidade, e por terem me acompanhando nesse momento tão importante para mim.

Agradeço à minha prima Luara, que sempre acreditou em mim, e foi minha parceira e confidente em tantos momentos.

Agradeço aos irmãos e amigos que a graduação me deu, Camilla, Marcos e Clarisse, obrigada por todas as risadas em dias tensos. Mar e Tai, obrigada por serem meu ombro amigo e meu alicerce dentro da universidade, agradeço a vocês por me ouvirem, aconselharem, rirem das minhas maluquices e por todos os momentos que vivemos juntas.

Agradeço à minha segunda família, meus amigos e colegas de laboratório. Agradeço à Taissa por não ter me jogado no mar durante a expedição (rs), e agora ser minha amiga e a pessoa que muitas vezes me trás à realidade. Agradeço à Lili, por ter chegado em um momento muito agitado, mas com toda sua doçura e conhecimento ter sido uma peça chave que nos ajudou, e hoje é indispensável nas nossas vidas. Agradeço ao Flúvio por eternas horas de companhia durante extrações de DNA, por ter virado um grande amigo, e por ter me aconselhado e ajudado em vários momentos. Agradeço à Mariazita por toda diversão, conversas e sabedoria que me passou. Agradeço à Cami, por todas as vezes que me ouviu e compartilhou comigo de momentos felizes e conversas longas sobre as discrepâncias sociais, além de ter me ajudado no processo de escrita deste documento e toda orientação que me passou, ainda por me fazer conhecer Washignton que se tornou também membro dessa família que a vida me deu. Agradeço ao Eikon e à Carol Coralinea por terem se tornado minha companhia e amigos durante os últimos dias de escrita, obrigada pela força e estarei sempre aqui para vocês. Agradeço também ao Alê e à Barbie, por terem compartilhado comigo suas experiências com esponjas marinhas, por todo apoio e por estarem sempre disponíveis a tirarem minhas dúvidas e a me ensinarem. Agradeço à Bea, Dani e ao Sr. Edir por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço à Caren, por ter me acompanhado e orientado ao longo do processo desse projeto, por todos os conselhos, cuidado, por me ajudar a finalizar esse trabalho. Agradeço à prof. Flávia, por ter assumido minha orientação sem nem me conhecer, e por ter sido generosa

e atenciosa comigo em momentos críticos, como costumava dizer, sua chegada foi a melhor coisa que aconteceu em nossas vidas.

Agradeço ao Carlos, por ter me ajudado incansavelmente com os problemas do meu computador, muito obrigada pela paciência ao me ouvir, por estar do meu lado, e por cuidar e permanecer comigo em momentos de aflição e ansiedade.

A todos vocês, minha gratidão, por fazerem esse trabalho ser o que ele é, por todo conhecimento e experiência compartilhados, vocês são minhas fontes de inspiração.

Agradeço ao prof. Alexandre Rosado e à Junia por terem me dado a oportunidade de entrar no LEMM, e à prof. Raquel por ter me permitido fazer parte desse projeto tão incrível. Certamente a experiência será para a vida toda.

Aos prof. Alexandre e Raquel, minha gratidão eterna, por além de terem me dado uma oportunidade, terem investido na minha educação, e por terem acreditado no meu potencial.

Por fim, agradeço as ações de políticas públicas de ensino instituídas nesse país, sem elas eu não chegaria onde cheguei, e graças a elas eu tive a grande oportunidade de realizar um dos meus maiores sonhos.

A todas as pessoas que torceram por mim durante essa caminhada, seja de perto ou de longe, serei eternamente grata a vocês. Por todo acolhimento e palavras de afirmação, que a vida seja tão generosa com vocês quanto foi comigo por tê-los colocado na minha.

Meus agradecimentos a agência fomentadora desse trabalho.

RESUMO

LAENNE GOMES DE MEDEIROS

Micro-organismos de Recifes de Coral de Oceano Profundo: Isolamento, Identificação e Filogenia

Orientadora: Flávia Lima do Carmo

Co-orientadora: Caren Leite Spindola Vilela

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

Os corais e esponjas de oceano profundo estabelecem associações simbióticas únicas com micro-organismos diversos, que apresentam funções chaves para o funcionamento do ecossistema, como a ciclagem biogeoquímica, produção de compostos antimicrobianos e degradação de compostos tóxicos. A relação hospedeiro-micro-organismo é essencial para garantir a saúde e sobrevivência dos animais neste ambiente considerado extremo, devido à ausência de luz, alta pressão hidrostática, pouca disponibilidade de nutrientes e baixas temperaturas. Ainda, os micro-organismos de oceano profundo podem ser importantes fontes de produtos com aplicações biotecnológicas, que podem ser utilizados para fins de conservação dos recifes de coral frente a distúrbios causados por diversos fatores. Diante disso, este trabalho tem como objetivo isolar micro-organismos de amostras de recifes de coral de oceano profundo (corais, esponjas, água e sedimento), com o uso de técnicas de microbiologia tradicional, como o cultivo e isolamento em meios de cultura ricos e/ou seletivos, e ainda identificar os isolados através do sequenciamento do gene rRNA 16S para afiliação filogenética. Para isso, as amostras foram coletadas durante a expedição oceanográfica do projeto PROBIO-DEEP, na Bacia de Campos, RJ nas profundidades de 600-800 m, em cinco pontos de coleta. Ainda a bordo, as amostras foram processadas para o cultivo dos micro-organismos em 16 meios de cultura, com

o plaqueamento e inóculo de 100µl em meios sólidos ou líquidos, com incubação a 6°C e 26°C até que se observasse crescimento. Os isolados obtidos tiveram seu DNA extraído e foram identificados pelo sequenciamento do gene rRNA 16S. As sequências foram analisadas por meio da plataforma Sanger Pipeline do *Ribosomal Database Project* (RDP), e os contigs e a árvore filogenética montados pelos softwares Bioedit e MEGA X, respectivamente. O cultivo microbiano possibilitou o isolamento de 286 estirpes bacterianas, distribuídas nos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, em ordem de abundância. Um total de 37 gêneros microbianos foram obtidos, sendo o gênero *Pseudoalteromonas* predominante nas amostras de coral e esponja. Nos corais, os gêneros *Acinetobacter* (21%) e *Vibrio* (15%) também foram abundantes. Nas esponjas, o gênero *Photobacterium* foi dominante, com 22 isolados (15.9%), seguido de *Moritella* (13%) e *Acinetobacter* (10.8%). As amostras de água tiveram a predominância do gênero *Bacillus* (23%), seguido de *Pseudoalteromonas* (18%) e *Erythrobacter* (17%). Os resultados do sequenciamento e afiliação filogenética demonstraram que alguns micro-organismos apresentam a possibilidade de serem espécies ou até mesmo gêneros novos, devido às baixas similaridades com as sequências dos bancos de dados (<95%). Este dado indica a importância de estudos mais aprofundados acerca dos micro-organismos de oceano profundo como forma de identificar possíveis novas espécies e metabolismos, que podem ser utilizados em futuras aplicações biotecnológicas e como ferramenta de monitoramento e conservação desses recifes.

Palavras-chave: *oceano profundo, isolamento microbiano, biologia molecular, filogenia*

ABSTRACT

LAENNE GOMES DE MEDEIROS

Microorganisms from Deep Sea Coral Reefs: Isolation, Identification and Phylogeny

Orientador: Flávia Lima do Carmo

Co-orientador: Caren Leite Spindola Vilela

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 em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso

Deep sea corals and sponges establish unique symbiotic associations with diverse microorganisms, which exhibit key functions for ecosystem functioning, such as biogeochemical cycling, production of antimicrobial compounds, and degradation of toxic compounds. The host-micro-organism relationship is essential to ensure the health and survival of animals in this environment that is considered extreme due to the absence of light, high hydrostatic pressure, low nutrient availability, and low temperatures. Furthermore, deep sea microorganisms may be important sources of products with biotechnological applications, which can be used for coral reef conservation purposes when facing disturbances caused by several factors. In view of this, this work aims to isolate microorganisms from deep sea coral reef samples (corals, sponges, water and sediment), using traditional microbiology techniques, such as cultivation and isolation in rich and/or selective culture media, and also to identify the isolates through 16S rRNA gene sequencing for phylogenetic affiliation. For this, the samples were collected during the oceanographic expedition of the PROBIO-DEEP project, in the Campos Basin, RJ at depths of 600-800 m, in five collection points. Still on board, the samples were processed for the cultivation of microorganisms in 16 culture media, with the plating and inoculation of 100µl in solid or liquid media, with incubation at 6°C and 26° C until growth was observed. The isolates obtained had their DNA extracted and were identified by sequencing the 16S rRNA gene. The sequences were analyzed using the Sanger Pipeline platform of the *Ribosomal Database Project* (RDP), and the contigs and phylogenetic tree were assembled by Bioedit and MEGA X software, respectively. Microbial culture enabled the isolation of 286 bacterial strains,

distributed in the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, in order of abundance. A total of 37 microbial genera were obtained, with the genus *Pseudoalteromonas* predominating in the coral and sponge samples. In corals, the genera *Acinetobacter* (21%) and *Vibrio* (15%) were also abundant. In sponges, the genus *Photobacterium* was dominant with 22 isolates (15.9%), followed by *Moritella* (13%) and *Acinetobacter* (10.8%). The water samples had a predominance of the genus *Bacillus* (23%), followed by *Pseudoalteromonas* (18%) and *Erythrobacter* (17%). The results of sequencing and phylogenetic affiliation showed that some microorganisms have the possibility of being new species or even genera, due to the low similarities with the database sequences (<95%). This data indicates the importance of further studies on deep ocean microorganisms as a way to identify possible new species and metabolisms, which can be used in future biotechnological applications.

Key-words: *deep sea, molecular biology, microbial isolation, phylogeny*

RESUMO PARA LEIGOS

LAENNE GOMES DE MEDEIROS

MICRO-ORGANISMOS DE RECIFES DE CORAL DE OCEANO PROFUNDO: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E FILOGENIA

Orientador: Flávia Lima do Carmo

Coorientador: Caren Leite Spindola Vilela

Resumo para leigos 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

O oceano profundo é um ecossistema marinho com características únicas, sendo considerado um ambiente “extremo para a vida” devido às baixas temperaturas, altas pressões, ausência de luz e poucos nutrientes disponíveis. No oceano profundo, destacam-se os recifes de coral, que abriga uma grande variedade de animais, como corais e esponjas. Este ambiente funciona como verdadeiro berçário para diversos organismos marinhos, sendo um local importante de proteção e reprodução desses animais. Os corais e esponjas formadores dos recifes de coral de oceano profundo vivem interagindo com uma grande diversidade de micro-organismos, essenciais para a sua sobrevivência neste ambiente extremo. Acredita-se que os micro-organismos que vivem associados com esses animais sejam capazes de protegê-los contra doenças, ajudar na aquisição de nutrientes, e ainda na manutenção da sua saúde. Diante disso, este trabalho teve como objetivo obter, cultivar e identificar micro-organismos de recifes de coral de oceano profundo, usando como fonte amostras de corais, esponjas, água e sedimento. Para isso, as amostras foram coletadas durante a expedição de navio do projeto PROBIO-DEEP, na Bacia de Campos, RJ em profundidades entre 600-800 m, em cinco pontos de coleta. Ainda a bordo, as amostras foram cultivadas em meios adequados, e incubados a 6°C e 26°C até que o crescimento dos micro-organismos fosse observado. As bactérias obtidas tiveram seu material analisado por softwares de bioinformática, e a ação conjunta dessas metodologias possibilitou o isolamento e identificação de 286 isolados bacterianos, sendo distribuídos entre os 4 maiores filos do Domínio Bacteria. Destes, cerca de 32 micro-organismos apresentaram a possibilidade de serem espécies

ou gêneros novos, o que indica a importância de estudos mais aprofundados desses microorganismos de oceano profundo que possam ser utilizados em futuras áreas industriais e biotecnológicas.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
RESUMO PARA LEIGOS	xii
ÍNDICE	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OCEANO PROFUNDO.....	1
1.2 CORAIS E ESPONJAS DE OCEANO PROFUNDO	3
1.2.1 Corais de Oceano Profundo.....	3
1.2.2 Esponjas de Oceano Profundo.....	6
1.3 MICRO-ORGANISMOS DE OCEANO PROFUNDO	10
1.4 MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A CORAIS E ESPONJAS	12
1.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DE OCEANO PROFUNDO.....	16
1.5.1 Cultivo de micro-organismos de oceano profundo	16
1.5.2 Identificação filogenética de micro-organismos de mar profundo.....	17
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVO GERAL	21
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5 METODOLOGIA	21
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS	21
5.3 PLAQUEAMENTO E MEIOS DE CULTURA	26
5.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	29
6 RESULTADOS.....	31
6.1 ISOLAMENTO E TAXONOMIA DOS MICRO-ORGANISMOS	31
6.1.1 Relação de gêneros encontrados por meios de cultura.....	32
6.2 ÁRVORES FILOGENÉTICAS	43
7 DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÃO	53
9 ANEXOS.....	55
9.1 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE ESPONJAS	55
9.2 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE CORAIS.....	62
9.3 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE ÁGUA.....	70
9.4 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE SEDIMENTO	71
9.5 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	75

9.5.1 MetM.....	75
9.5.2 MB20.....	78
9.5.3 MMM + hidrocarbonetos específicos.....	78
9.5.4 MMM + hidrocarbonetos (filtro de papel)	79
9.5.5 BH + óleo (insolúvel).....	80
9.5.6 BH + óleo (solúvel).....	80
9.5.7 Medium A	81
9.5.8 TCBS.....	82
9.5.9 R2A	82
9.5.10 MA	83
9.5.11 MA 50%	83
9.5.12 MMM + Coral Juice.....	83
9.5.13 Ammonia oxidizer.....	84
9.5.14 K medium + metanol.....	86
9.5.15 SOB e SOB + glicose.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 OCEANO PROFUNDO

O oceano profundo é um dos maiores ecossistemas da Terra, onde somente 16% das espécies presentes neste ambiente são conhecidas e efetivamente nomeadas (Costello e Chaudhary, 2017). Sendo considerado oceano profundo a partir de uma profundidade de 200 m, este ecossistema pode ser dividido em zonas distintas de acordo com as massas d'água, como a zona mesopelágica, que compreende as camadas de água com cerca de 150-1000 metros de profundidade, e a zona batipelágica ou batial, que fica abaixo dos 1000 metros de profundidade, além de outras zonas que podem se apresentar em profundidades ainda maiores, como as zonas abissais e hadopelágicas que são encontradas em 2000 a 6000 metros de profundidade (Warrant e Locket, 2004; Rogers, 2015). Nessas zonas dos oceanos há ausência ou pouca penetração de luz, o que impede a realização da fotossíntese (Warrant e Locket, 2004). Ainda assim, o ambiente de oceano profundo abriga uma grande biodiversidade de espécies marinhas, e apresenta características ambientais distintas, como temperaturas geralmente baixas, que podem variar de acordo com a profundidade como por exemplo o que pode ser encontrado nas fossas Marianas, Pacífico Ocidental (Yayanos, Dietz e Boxtel, 1981); águas com pouca concentração de nutrientes (Warrant e Locket, 2004), sendo necessário que haja revolvimento do mar por meio de ressurgências para que os nutrientes presentes na superfície possam abastecer os ambientes mais profundos. Esse processo é conhecido como bomba biológica, que consiste na entrada de nutrientes e matéria biológica em camadas mais profundas do oceano (Longhurst e Harrison, 1989; Ducklow *et al.*, 2001; Arrigo, 2005); alta pressão hidrostática, que vai de 1 atm e aumenta com a profundidade (Horikoshi 1998; Warrant e Locket, 2004). Diante das únicas características encontradas no oceano profundo, nas últimas décadas, essas áreas têm despertado o interesse da comunidade científica devido a potenciais descobertas de interesse no ramo da microbiologia e biotecnologia (Jannasch e Taylor, 1984; Thompson *et al.*, 2018). Apesar disso, as águas profundas são ambientes pouco estudados, o que destaca a importância de investigações mais detalhadas acerca de sua biodiversidade, incluindo os seus micro-organismos, e os potenciais produtos biotecnológicos oriundos deste local. Como exemplo, destacam-se os compostos

bioativos, que podem ser bioprospectados e utilizados em aplicações industriais e terapêuticas, e podem ser interessantes economicamente (Thompson *et al.*, 2018; Modolon *et al.*, 2020).

Os ecossistemas de oceano profundo do Brasil têm sido evidenciados graças à sua grande diversidade de vida marinha, como os recifes de coral, peixes, esponjas e seus microbiomas associados (Costello e Chaudhary, 2017; Kitahara *et al.*, 2020). Este ambiente é bastante explorado quanto à cultura da pesca e busca por combustíveis fósseis (Costello e Chaudhary, 2017; Sumida, De Leo e Bernardino, 2020). Os oceanos profundos do Brasil, assim como as suas águas rasas, são ambientes que tem gerado conhecimento acerca da sua biodiversidade, além disso, esse é o local de estudo de muitos trabalhos voltados para o entendimento ao aquecimento dos oceanos e outros estresses ambientais. Ao longo dos anos, esses ambientes tem ganhado grande atenção de cientistas e instituições não governamentais devido aos perigos associados às mudanças climáticas e impactos antrópicos (Brown, 1996; Danovaro, Dell'Anno e Pusceddu, 2004; Rosado *et al.*, 2019; Trotter *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2020). Por exemplo, os eventos de branqueamento dos corais de mar raso têm sido amplamente pesquisados por diversos cientistas como forma de tentar compreender este fenômeno, e em busca de maneiras de contorná-lo ou evitá-lo, como é o caso do estudo proposto por Peixoto e colaboradores (2017). Nesta pesquisa foi sugerida a utilização de probióticos para corais, que seriam um consórcio concentrado de microorganismos benéficos para os corais (BMCs), utilizados para ajudar a criar resiliência e resistência ao aumento de temperatura das águas e outros estresses ambientais. O conceito BMC pode ser extrapolado para os corais de mar profundo e aplicado neste ambiente, que também podem sofrer impactos ambientais, principalmente provocados pelas atividades industriais e antrópicas no mar profundo (Costello e Chaudhary, 2017; Peixoto *et al.*, 2017). Dentre as principais ameaças aos recifes de oceano profundo, destacam-se a busca e exploração de petróleo e gás, deposição de lixo orgânicos, poluição, sedimentação, a pesca extensiva, acidificação, além da deposição de microplásticos e outros poluentes, que podem influenciar diretamente na biodiversidade dos mares (Woodall *et al.*, 2014; Spalding e Brown, 2015; Gammon *et al.*, 2018; De Leo, Bernardino e Sumida, 2020; Vilela *et al.*, 2022).

Além da importância ecológica do ecossistema marinho de profundidade, o Brasil ainda possui uma Zona Econômica Exclusiva (Exclusive Economic zone - EEZ) de cerca de 3,6 milhões de km², que coloca o país na 11^a posição do ranking mundial

de costas que são consideradas satisfatórias para exploração industrial, sendo denominada pelo governo brasileiro como “Amazônia Azul”, fazendo referência à Floresta Amazônica (Sumida, De Leo e Bernardino, 2020). Em cerca de 600.000 km² desta zona, podem ser encontradas comunidades bentônicas (Sumida, De Leo e Bernardino, 2020), que são comunidades de recifes de coral, estuários e mangues, além de comunidades de crustáceos e pequenos organismos, como protozoários e diatomáceas, que podem estar fixados ao fundo do ambiente marinho, ou percorrer esse ambiente de maneira errante (Mare, 1942). Essas comunidades biológicas podem ser encontradas entre 200 e 3000 m de profundidade, o que representa cerca de $\frac{2}{3}$ desta zona da costa Brasileira (Sumida, De Leo e Bernardino, 2020). A diversidade de organismos encontrada no ambiente marinho pode estar associada às massas de água que circulam nesse território, que viabilizam a troca de nutrientes no ambiente e permite sua riqueza heterogênea, sendo a circulação de compostos bioquímicos essencial para a sobrevivência e manutenção das comunidades bêmicas locais (Bernardino, Berenguer e Ribeiro-Ferreira, 2016; Silveira, Napolitano e Farias, 2020). Em contrapartida do que poderia se imaginar, o oceano profundo é um ambiente muito biodiverso, sendo também um ambiente quimiosintético, que desempenha funções essenciais para a manutenção dos hospedeiros e seus micro-organismos associados, o que o torna um campo vasto para novas descobertas na pesquisa (McClain e Hardy, 2010).

1.2 CORAIS E ESPONJAS DE OCEANO PROFUNDO

1.2.1 Corais de Oceano Profundo

Os recifes de coral são estruturas rochosas presentes nos oceanos formada principalmente pelo esqueleto calcário dos corais, seu principal componente estrutural (Knowlton, 2001). Os corais são animais pertencentes ao filo dos Cnidários, que apresentam uma grande diversidade de espécies na costa do Brasil, sendo este filo um dos três maiores da árvore evolutiva, com organismos datados da era Pré-Cambriana (Kitahara *et al.*, 2020). Neste filo podem ser encontrados um vasto número de organismos divididos em duas classes, que são *Anthozoa* e *Medusozoa*, que se diferem pelo seu estágio larval e presença de um genoma mitocondrial (Kitahara *et al.*, 2020). Na classe *Anthozoa*, estão inseridos os corais, com aproximadamente 7.000 espécies de animais que são divididos em duas subclasses, os *Octocorallia* e *Hexacorallia*

(Kitahara *et al.*, 2020).

Os organismos presentes na subclasse Hexacorallia são os mais abundantes, e descobertas fósseis indicam que essa grande abundância é devida sua morfologia esquelética, representando fases evolutivas importantes na classe devido à episódios de calcificação notados nesses organismos (Han *et al.*, 2010). A ordem Scleractinia é importante para a construção dos recifes de coral, com a produção de secreções areníticas que resulta em um esqueleto calcáreo contínuo, estando cerca de 40% desses animais a cerca de 50 m de profundidade (Kitahara *et al.*, 2020). Os corais presentes na classe Hexacorallia e ordem Scleractinia podem ser categorizados ecologicamente pela presença ou ausência de microalgas pertencentes a família Symbiodinacea, que compreendem diferentes clados de dinoflagelados unicelulares, com capacidade fotossintética (Ramsby *et al.*, 2014). Sendo assim, os corais podem ser classificados como zooxantelados, azooxantelados e zooxantelados facultativos, de acordo com a presença ou ausência das algas dinoflageladas (Wakefield, Farmer e Kempf, 2000; Kitahara *et al.*, 2020). Essas zooxantelas, como são conhecidas popularmente, são consideradas simbioses dos corais e que lhes auxiliam na captação e produção de nutrientes, nas atividades fotossintéticas, promovendo a fixação de carbono e auxiliando na calcificação, estando presente nos tecidos do coral (Wakefield, Farmer e Kempf, 2000; Peixoto *et al.*, 2017; Kitahara *et al.*, 2020). É importante salientar que os corais zooxantelados, recebem energia em sua maioria por parte de seus simbioses dinoflagelados, que são autotróficos, demonstrando seu auxílio não somente quanto à nutrição do coral, mas também à sua captação energética (Rohwer *et al.*, 2002; Kitahara *et al.*, 2020). Em contrapartida aos corais zooxantelados e zooxantelados facultativos, que são encontrados em ambientes com presença de luz, os animais azooxantelados não vivem em associação simbiótica com esses micro-organismos, fazendo sua alimentação por vias heterotróficas (Kitahara *et al.*, 2020).

Este grupo de corais que não possuem zooxantelas pode ser representado por corais solitários e cosmopolitas quanto a sua distribuição, como *Madrepora oculata* e *Desmophyllum pertusum*, por exemplo, que não são dependentes obrigatórios desses simbioses para sua manutenção no meio ambiente sendo encontrados no mar profundo, onde não há luz (Roberts e Cairns, 2014; Kitahara *et al.*, 2020).

Os corais da ordem Scleractinia podem ser considerados corais com característica de plasticidade, uma vez que podem se modificar fenotipicamente e genotipicamente, importante para sua viabilidade no ambiente marinho em que se

encontra (Todd, 2008). Corais dessa ordem são chamados “corais rochosos” (*stony corals*), e são organismos compostos de um esqueleto de carbonato de cálcio, que possuem pólipos interconectados, que formam todo seu corpo. Cada pólipos produz um esqueleto calcário, formando uma espécie de cálice que é chamada de coralita, local onde o pólipos pode se fixar e se retrair. A coralita é composta de aragonita e carbonato de cálcio que é secretada pelos pólipos, e é a massa dessas coralitas que forma uma colônia de coral (Wells, 1956 *apud* Todd, 2008). Como exemplos de espécies de coral constituintes dessa ordem podemos citar *Solenosmillia variabilis*, *Enallopsammia rostrata* e *Madrepora oculata* e *Desmophyllum pertusum* (**Figura 1**), já citados anteriormente, que além de serem caracterizados como “corais duros”, são cosmopolitas ou seja são amplamente encontrados em diferentes partes do mundo dos oceanos profundos (Auscavitch *et al.*, 2020; Kitahara *et al.*, 2020).

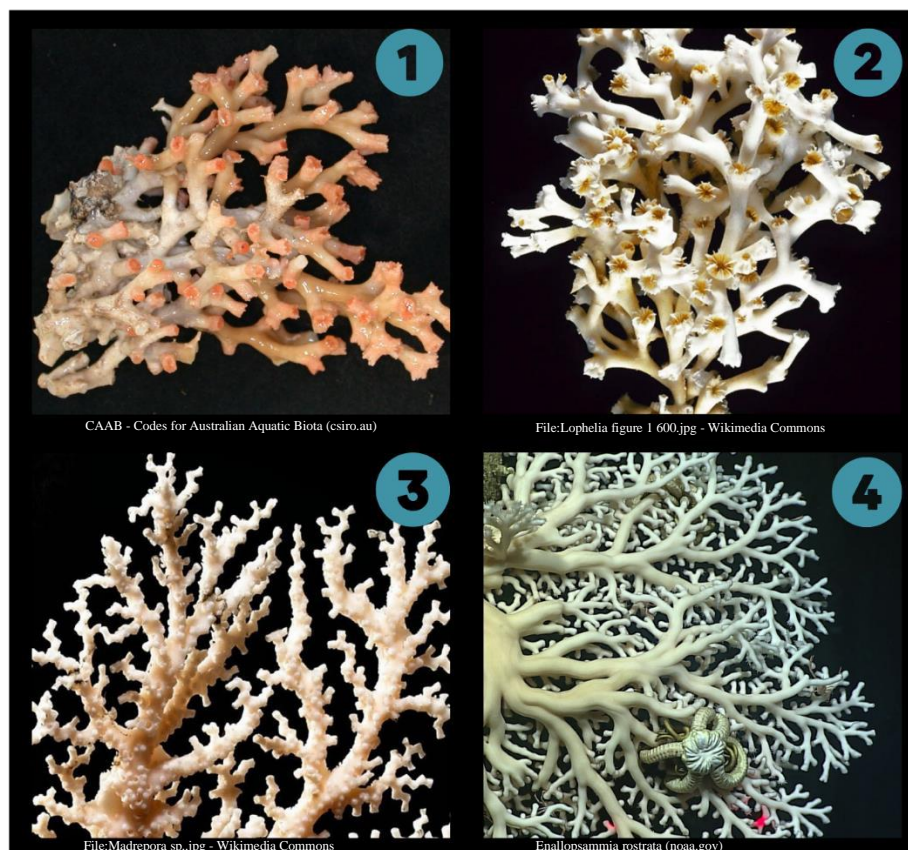


Figura 1 Corais encontrados em oceano profundo da ordem Scleractinia, também conhecidos como “corais rochosos” (*stony corals*). 1) *Solenosmillia variabilis*; 2) *Desmophyllum pertusum*; 3) *Madrepora* sp.; 4) *Enallopsammia rostrata* (Figura: Autor)

A classe Octocorallia, por sua vez, é um grande e monofilético grupo de cnidários (possuem um ancestral comum recente, onde todas as espécies conhecidas são seus descendentes diretos), com cerca de 3.400 espécies descritas, com pólipos e

sistemas mesentéricos completos (Kitahara *et al.*, 2020). Esta classe está distribuída em todo ambiente marinho, e apresenta organismos que chamam atenção por suas características de diversidade e abundância, o que gera uma dificuldade quanto à exatidão de espécies existentes, que são distribuídas em três ordens: Helioporacea, Pennatulacea e Alcyonacea (Pérez *et al.*, 2016; Kitahara *et al.*, 2020). O primeiro grupo, Helioporacea, é o único que possui esqueleto de aragonita contínuo, compreendendo 5 espécies; o segundo, Pennatulacea, abriga cerca de 225 espécies apresentando uma colônia não ramificada com pólipos axiais primários diferenciados em um pedúnculo bulbosar para ancoragem, e pólipos secundários dimórficos; e por fim, tem-se os Alcyonacea que é o grupo mais diverso entre os três, abrigando cerca de 1/3 das espécies descritas, mostrando grande abundância de espécies que se apresentam como monomórficos ou dimórficos, habitando em grandes extensões geográficas (Pérez *et al.*, 2016; Kitahara *et al.*, 2020). Os Octocorais podem ser encontrados em recifes de mares rasos e profundos onde são importantes componentes estruturais da comunidade nesses ambientes (Pérez *et al.*, 2016). Algumas espécies presentes na classe Octocorallia que podem ser encontrada em águas profundas pertencem à família *Chrysogorgiidae*, sendo *Chrysogorgia carolinensis* sp. nov. e *Chrysogorgia dendrítica* (Xu, Zhan e Xu, 2020) algumas espécies presentes nessa família, que também podem ser chamadas de Gorgônias. Além disso, essa classe também pode abrigar corais da família *Pennatulacea*, que são corais que se assemelham a uma pena, podendo ser citados as espécies *Protoptilum* sp. e *Renilla reniformis* como componentes dessa família (Kushida e Reimer, 2019).

1.2.2 Esponjas de Oceano Profundo

As esponjas são organismos taxonomicamente descritos no filo Porifera, e caracterizam-se por serem sésseis (Van Soest *et al.*, 2012), estando, portanto, fixados ao fundo do mar ou em algum substrato (Taylor *et al.*, 2007). Este filo é um dos mais diversos dos invertebrados, com cerca de pouco mais de 9.500 espécies descritas na literatura, presentes em todo o ambiente marinho de acordo com o World Porifera Database (Hooper e Van Soest, 2002, de Voogd *et al.*, 2022). Este grupo pode ser dividido em três subclasses, que são Hexactinellida, Calcarea e Demospongiae, que abriga um grande número de espécies (Taylor *et al.*, 2007). As esponjas são organismos filtradores constituídas por células epiteliais (pinacócitos) que recobrem toda sua

superfície interna e externa. Ainda, possuem um sistema de canais abertos por onde a água passa continuamente através de células flageladas, chamadas coanócitos, que auxiliam na movimentação da água no seu interior (Thakur e Müller, 2004).

Esses animais são exclusivamente aquáticos, tais como os corais, e por meio de filtração conseguem captar alimentos e nutrientes para si, dissolvendo-os (Van Soest *et al.*, 2012). As esponjas são globalmente importantes para o ecossistema marinho, principalmente devido às suas características filtrantes. A partir desse processo há a transformação da matéria orgânica dissolvida em particulada (Taylor *et al.*, 2007; Goeij *et al.*, 2013), que é disponibilizada para os detritívoros, que vai alimentar a cadeia trófica. Esse processo é especialmente interessante em habitats oligotróficos, onde há a liberação de compostos orgânicos essenciais para a manutenção do ecossistema marinho (Van Soest *et al.*, 2012; Goeij *et al.*, 2013). Além disso, as esponjas vivem em associação com simbioses microbianas, que também são importantes para o bom funcionamento dos recifes de corais, como por exemplo, a realização da ciclagem de nitrogênio e outros nutrientes (Webster *et al.*, 2013). Ainda, seus micro-organismos associados oferecem uma adaptação essencial para sua sobrevivência e funcionalidade, com uma comunidade microbiana bem estruturada que auxiliam as esponjas em diversas funções, tais como captação de nutrientes, promoção de resiliência a fatores físico-químicos (como pH e temperatura), além de uma resposta imune melhorada por meio da produção de compostos bioativos e citotóxicos que pode defender o organismo de estresses ambientais (Thakur e Müller, 2004). A interação esponja-micro-organismo representa uma relação ecologicamente benéfica para ambos os organismos, uma vez que as esponjas fornecem nutrientes que também são importantes para a sobrevivência do micro-organismo associado (Thomas *et al.*, 2016; Strand *et al.*, 2017). As esponjas também sofrem influências negativas em sua saúde em decorrência do aumento da temperatura dos oceanos, e outros estresses ambientais, que podem afetar diretamente a sua reprodução, e conseqüentemente suas sobrevivência (Strand *et al.*, 2017).

As esponjas são componentes importantes dos recifes de coral mesofóticos, que são localizados em profundidades de 30 m a 150 m de profundidade e necessitam de luz solar para fotossíntese dos organismos que ali habitam (Slattery e Lesser, 2012). As esponjas presentes em recifes de coral de mar raso sofrem com ações antrópicas tanto quanto corais presentes nesse ambiente, devido às atividades turísticas, de mergulho e pescas recreativas, além de estresses ambientais, que tem sido foco de novas pesquisas de monitoramento nesses locais (Pomponi *et al.*, 2019). No trabalho

de Diaz e Rützler (2001), os autores realizaram uma comparação de dados biológicos e ecológicos das esponjas, onde identificam seis parâmetros que tornam as esponjas componentes essenciais do ecossistema marinho: a diversidade, abundância (que inclui área de cobertura e biomassa), associações simbióticas com micro-organismos, espaço de competição, impacto aos recifes e trocas com a coluna d'água (Diaz e Rützler, 2001). Bem como corais, essas esponjas sofrem por fatores antrópicos e de mudanças climáticas, como por exemplo, pela acidificação dos oceanos, além disso esponjas podem sofrer com o aquecimento dos oceanos que pode afetar sua performance fisiológica, além de sua capacidade reprodutiva e dispersão (Carballo e Bell, 2017). O trabalho de Vicente (1989) foi o primeiro a descrever a mortalidade de esponjas devido ao aquecimento dos oceanos, ainda o trabalho de Webster, Cobb e Negri (2008) extrapola que além da mortalidade, as altas temperaturas presentes nos oceanos faz com que as esponjas percam seus simbiontes microbianos, o que pode ser visível pela necrose no tecido do holobionte e por problemas na estrutura celular, evidenciando a importância dessa associação.

Além disso, o estudo de esponjas de mar raso não é tão evidenciado por pesquisadores quanto às atividades antrópicas por esses organismos não serem “importantes” economicamente (quando se pensa na exploração para turismo) ou utilizadas em estudos de predição de vulnerabilidade frente a mudanças climáticas (Beazley *et al.*, 2021). Apesar disso, existem pesquisas que utilizam esponjas de mares rasos para entender a diversidade presente em diversos recifes (Diaz e Rützler, 2001), além de buscarem por possíveis aplicações biotecnológicas advindas desses animais. Um exemplo é o trabalho de Muricy e colaboradores (1993), que descreveu extratos de esponjas com função antimicrobiana das espécies *Cliona* sp., *Amorphinopsis* sp. e *Hemimycale* sp. da costa brasileira. As esponjas de mar raso e profundo podem apresentar diferenças morfológicas, como cor, tamanho das espículas e a organização do córtex, além de diferenças fenotípicas que mostraram que as esponjas encontradas no raso apresentam estrutura menores e menos desenvolvidas e comparação com os espécimes de regiões mais profundas (Cárdenas e Rapp, 2013).

No oceano profundo, dentro da classe Desmospongiae, pode-se citar o gênero que *Geodia* sp., como *Geodia barretti* (**Figura 2-1**), uma espécie que apresenta uma abundância de micro-organismos associados, que podem inclusive estarem envolvidos no ciclo de nitrogênio (Hoffman *et al.*, 2009). Na classe Hexactinellida tem-se as esponjas de vidro, que são distribuídas de maneira abundante em águas profundas e

podem ser representadas pela espécie *Farrea occa* (**Figura 2-2**), por exemplo (Dohrmann *et al.*, 2008). Quanto as esponjas pertencentes a classe Calcarea, podemos citar *Asclatis abyssus* sp. nov. proveniente da Antártica em profundidade de cerca de 2666 m (Rapp, Janussen e Tendal, 2011), que faz parte de um grupo de cerca de 675 espécies descritas nessa classe, sendo considerada uma das menos diversas comparado às outras classes de porífera (Voigt, Wülfig e Wörheide, 2012).



Figura 2 Exemplos de esponjas encontradas em ambiente de oceano profundo. 1) Esponja da espécie *Geodia barretti*; 2) Esponja da espécie *Farrea occa*. (Fonte: Autor)

1.3 MICRO-ORGANISMOS DE OCEANO PROFUNDO

O oceano profundo é um dos lugares mais extremos do Planeta, com ausência de luz, baixas temperaturas e grande pressão hidrostática (Jannasch e Taylor, 1984; Poli *et al.*, 2017). Este ambiente abriga micro-organismos diversos com características únicas de adaptação para a sua sobrevivência, como por exemplo o grupo dos micro-organismos **Barófilos**, que são capazes de sobreviver em pressões hidrostáticas elevadas, de até 100 atm ou mais, e **Psicrófilos**, que são micro-organismos capazes de viver e crescer em baixas temperaturas, em média de 3°C, tendo como sua temperatura ótima de 8°C a 15°C (Jannasch e Taylor, 1984; Horikoshi, 1998).

Os micro-organismos de oceano profundo possuem a capacidade de sobreviver nessas distintas condições abióticas devido a algumas adaptações genéticas reguladoras, enzimáticas e mecanismos biomoleculares (Costello e Chaudhary, 2017; Poli *et al.*, 2017). O estudo de Nakasone *et al.* (1998) demonstra que em *Shewanella* sp. DSS12 encontrada no oceano profundo em Ryukyu, China, possui genes regulados positivamente quando há elevação da pressão. Este gene é o *cydD* que foi primeiramente descrito por Poole *et al.* (1994) como sendo um gene presente na via de respiração aeróbia de *E. Coli* (Poole, Gibson e Wu, 1994). Em *Shewanella* sp. esse gene se mostrou resistente à altas pressões, demonstrando ser necessário para a sobrevivência do micro-organismo frente às condições de elevadas pressões por tornar esse micro-organismo mais resistente frente a esses fatores (Nakasone *et al.*, 1998).

Também já foram vistas proteínas de auxílio ao choque térmico, que são chamadas de proteínas de choque ao frio (do inglês “*cold shock proteins*”, as Csp), que são capazes de auxiliar no sistema metabólico celular frente ao estresse de diminuição da temperatura (Poli *et al.*, 2017). Essas proteínas são produzidas por micro-organismos e são importantes para manter a integridade da célula pois em resposta à temperatura, são capazes de diminuir as atividades metabólicas das células, tais como atividade enzimática, reduzindo a transcrição gênica, e estabilizando os ácidos nucleicos e estruturas secundárias (Keto-Timonen *et al.*, 2016). Além disso, para que mantenham sua integridade, muitos destes micro-organismos sofreram adaptações em suas membranas para a sua sobrevivência. Por exemplo, micro-organismos psicrófilos possuem uma composição lipídica insaturada que auxilia na sua manutenção em baixas temperaturas (Poli *et al.*, 2017). No estudo de Bowman *et al.* (1997) é demonstrado que *Shewanella gelidimarina* e *Shewanella fridimarina*, isoladas de águas profundas e de

uma amostra de gelo, respectivamente, além de terem grande atividade enzimática, suas membranas lipídicas são constituídas por ácido eicosapentaenoico (Bowman *et al.*, 1997), um ácido graxo insaturado, conhecido por ser o maior ômega-3 descrito, importante na composição da membrana celular de animais, tais como peixes, e que atualmente é bem estudado na aplicação de produtos farmacêuticos (Yazawa, 1996). Esse composto auxilia esses micro-organismos frente à baixas temperaturas, tornando a membrana mais fluida, preservando a célula por meio de osmorregulação intracelular (Bowman *et al.*, 1997; Poli *et al.*, 2017).

Embora seja um ambiente hostil para alguns organismos devido suas características de alta pressão, baixas temperaturas, ausência de luz e menores concentrações de oxigênio, o mar profundo apresenta grande número de micro-organismos que se mostram adaptados a essas condições (Costello e Chaudhary, 2017). Neste ambiente podem ser encontrados os bacterioplânctons, que são micro-organismos que fazem parte da cadeia alimentar de organismos aquáticos, contribuindo significativamente para esse ecossistema por serem excelentes indicadores de impactos humanos no ambiente (Cesar e Abreu, 2001; Robarts e Carr, 2009). Além dos bacterioplânctons, bactérias dos gêneros *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella* e *Psychromonas* também podem ser encontradas neste ecossistema, por suas características psicrófilicas (Nakasone *et al.*, 1998; Poli *et al.*, 2017).

Quanto à presença desses micro-organismos no oceano profundo, podemos inferir que esse é um ambiente muito diverso quanto aos gêneros microbianos que podem ser encontrados, mostrando que esse local, além de possuir uma variedade de recifes de coral singular, possui também uma grande diversidade microbiológica em associação com diferentes corais e outras espécies marinhas (Kellog, 2019).

Além disso, esses micro-organismos apresentam mecanismos de resistência que lhe permitirem sobreviver em condições de oceano profundo, e ainda demonstraram ser fonte de possíveis produtos com aplicação no ramo da biotecnologia. Para a sua manutenção no oceano profundo, esses micro-organismos são capazes de produzir biomoléculas que agem auxiliando na sua estabilização frente aos múltiplos fatores abióticos enfrentados pelo organismo, como por exemplo altas pressões, baixas temperaturas, falta de nutrientes e outros componentes importantes para sua sobrevivência (Poli *et al.*, 2017). Como no estudo de Qin, Huang e Liu (2013) onde foi descrita uma α -amilase em *Zunongwangia profunda*, isolada de oceano profundo em Fujian, China, sendo essa enzima uma endoamilase que é capaz hidrolisar moléculas

de amido, sendo muito importante para possíveis aplicações biotecnológicas devido sua habilidade de permanecer estável em condições de baixa temperatura e pressão, tais como encontradas em mar profundo (Qin, Huang e Liu, 2013).

1.4 MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A CORAIS E ESPONJAS

Os estudos sobre a associação entre corais e micro-organismos de oceano profundo são datados de muitas décadas, sendo o primeiro estudo publicado em 2006 (Yakimov, 2006; Lawler *et al.*, 2016). Os corais e esponjas, como dito anteriormente, são seres holobiontes, que albergam uma grande diversidade de micro-organismos, como bactérias, vírus, fungos, que podem desempenhar papéis importantes na saúde desses animais e no seu metabolismo (Pogoreutz *et al.*, 2020), como demonstrado na **Figura 3**.

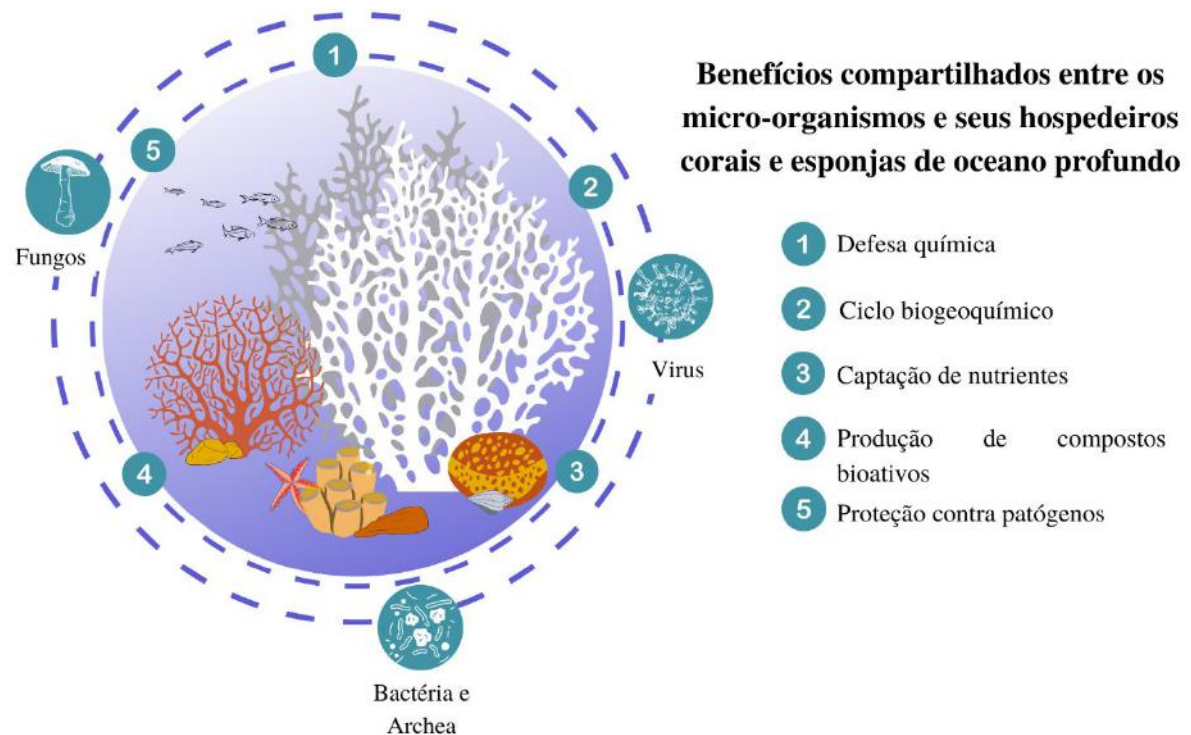


Figura 3 Principais benefícios da associação simbiótica de micro-organismos e corais e esponjas de mar profundo.

Os corais são compostos de dois tipos teciduais, epiderme e gastroderme, e uma camada de muco, onde todas essas estruturas são ricas em micro-organismos (Rosenberg *et al.*, 2007). Em toda a estrutura dos corais é possível encontrar uma complexa e dinâmica comunidade de micro-organismos associados (Rosenberg *et al.*, 2007). Além das algas dinoflageladas da família Symbiodinaceae (quando em corais de águas rasas) (Wakefield, Farmer e Kempf, 2000; Peixoto *et al.*, 2017), podemos encontrar uma grande diversidade de micro-organismos pertencentes a diferentes filos. Como os gêneros *Alteromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, e *Photobacteria*, por exemplo que pertencem ao filo Proteobacteria, um dos filos mais abundantes do domínio Bacteria (Rohwer *et al.*, 2002; González e Whitman, 2006), e até mesmo micro-organismos potencialmente patogênicos como as espécies *Aspergillus sydowii* e *Thalassomonas loyana* que são capazes de causar doenças em corais quando estes se encontram sob algum estresse (Rosenberg *et al.*, 2007).

Nos corais, a associação de micro-organismos é considerada espécie-específica, onde diferentes espécies de coral possuem distintas comunidades

microbianas (Lawler *et al.*, 2016). Além disso, esses micro-organismos podem possuir um *core* microbiano conservado que pode servir para a elucidação da relação entre os micro-organismos e seu hospedeiro, assim como relacionar com as suas possíveis funções e o auxílio que pode promover na saúde dos corais (Lawler *et al.*, 2016; Kellog, 2019). No estudo de Kellog (2019) foi relatada a associação de micro-organismos com os corais podendo ser uma peça essencial para decifrar o caminho para o entendimento, identificação e estudo acerca dos corais e seus simbiontes microbianos. Por exemplo, no trabalho de Neulinger e colaboradores (2009) é mostrada a associação de *Desmophyllum pertusum*, com *Candidatus Mycoplasma corallicola*, encontrada em abundâncias nessas amostras por meio de técnicas independentes de cultivo, sugerindo sua possível influência na nutrição e saúde do coral (Neulinger *et al.*, 2009).

O trabalho de Yakimov *et al.*, (2006), um dos primeiros trabalhos de microbioma de corais de oceano profundo, descreve a associação microbiana dos corais do ambiente de oceano profundo do grupo Scleractinia, e no mesmo ano, Penn *et al.*, (2006) descreveram a comunidade microbiana de corais negros. Ambos os trabalhos fazem a descrição das comunidades microbianas de corais de oceano profundo, da coluna d'água e de sedimento utilizando-se de métodos tradicionais de cultivo microbiano e de biologia molecular, o que levou a um aumento do interesse na busca e maior entendimento por essas associações simbióticas de corais e seus microbiomas associados. Por exemplo, em *Madrepora oculata* (Hansson *et al.*, 2009) e em octocorais como *Paragorgia arborea* (Gray *et al.*, 2011) por meio de investigação filogenética observou-se que em ambas espécies podem ser encontradas bactérias das classes Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacterioidetes, mostrando a grande diversidade de micro-organismos associados em simbiose com seus holobiontes.

Assim como os corais, as esponjas de oceano profundo também possuem uma diversa e abundante variedade de micro-organismos em associação aos seus tecidos (Taylor *et al.*, 2007). São observadas relações de simbiose das esponjas com micro-organismos que podem chegar a compor cerca de 50% de seu tecido, sendo importantes na captação de nutrientes, transporte de metabólitos, além de contribuir na defesa química das esponjas (Wang, 2006). Devido a variedade de esponjas encontradas em oceano profundo, tem-se atraído a atenção de pesquisadores no mundo inteiro pela sua associação com micro-organismos que podem ser de interesse industrial graças a sua riqueza de substâncias bioativas (Thakur e Müller, 2004; Nishijima *et al.*, 2010).

Além disso, esponjas podem ter associações com arqueias e micro-organismos eucarióticos, o que aumenta ainda mais a curiosidade das associações que podem estar co-existindo nesse animal no ambiente marinho (Kennedy *et al.*, 2014).

As esponjas podem ser classificadas de acordo com a sua abundância de micro-organismos simbiotes sendo categorizados em alta abundância microbiana (do inglês, HMA “*high microbial abundance*”) onde o organismo apresenta uma densidade maior e mais diversa de micro-organismos associados, ou como tendo baixa abundância microbiana (do inglês LMA “*low microbial abundance*”) onde a densidade microbiana encontrada é menor e menos diversa (Moitinho e Silva *et al.*, 2017; Astudillo-García *et al.*, 2020). O hospedeiro pode abrigar uma comunidade microbiana específica, estável e altamente diversificada, que pode ser adquirida por meio de transmissão horizontal (por meio das correntes marinhas), bem como vertical (passado para sua progênie) (Ribes *et al.*, 2012). Ainda, a relação simbiótica esponja-microbioma pode ter sua homeostase desestabilizada por distúrbios e mudanças ambientais, atingindo diretamente a saúde do holobionte, como na sua fisiologia e metabolismo (Moitinho-Silva *et al.*, 2017; Glasl *et al.*, 2018).

Esses organismos podem apresentar associação com 41 tipos diferentes de filoprocariontes, sendo 13 desses compartilhados entre 81 espécies de esponjas conhecidas (Thomas *et al.*, 2016). Em geral, a composição bacteriana entre HMA e LMA pode diferir de acordo com os filos presente nesses organismos. Em esponjas LMA podem ser encontradas Proteobacteria e Cyanobacteria, enquanto em esponjas HMA há um domínio de Chloroflexi, Acidobacteria e Actinobacteria, tendo essas esponjas cerca de um terço de sua biomassa composta por esses micro-organismos (Vacelet e Donadey, 1977). Além desses grupos bacterianos, também podemos diferenciar essas esponjas por suas funções gênicas, taxa de filtração e seus ciclos de carbono e nitrogênio (Glasl *et al.*, 2018). O trabalho de Steffen *et al.*, 2022 realizou uma comparação entre *Geodia barretti*, *Stryphnus fortis* e *Weberella bursa* em profundidades de 244 a 1476 m, e mostrou que *S. fortis* e *G. barretti* são fortes candidatos a serem HMA, enquanto *W. bursa* está presente no grupo de esponjas com baixa abundância microbiana. Para chegar a esses resultados, eles observaram que aproximadamente 17 filos procarióticos estariam associados a 14 espécimes de *G. barretti*, 20 filos a 15 espécimes de *S. fortis* e 13 filos a 16 espécimes de *W. bursa*, o que conclui a diversa abundância de comunidade microbiana em *G. barretti* e *S. fortis* em contrapartida com *W. bursa*. É interessante salientar que esse método de

classificação pode ser utilizado para esponjas de mar raso e profundo, e a profundidade não necessariamente afeta a comunidade microbiana presente no holobionte (Steffen *et al.*, 2022).

Em associação com as esponjas, podemos citar *Penicillium chrysogenum*, um fungo que se mostra como um novo produtor de alcalóide, um composto importante na terapêutica humana (Thakur e Müller, 2004), e outros fungos dos filos Ascomycota e Zygomycota (Wang, 2006). Além desses, foi relatada a espécie *Oscillatoria spongillidae*, uma bactéria isolada de diferentes espécies de esponjas do gênero *Dysidea* (Wang, 2006), e outros gêneros bacterianos, como *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, e bactérias presentes no filo de Cianobacteria entre outras (Taylor *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2013). Sabe-se que há uma grande diversidade de grupos microbianos associados às esponjas presentes em mar profundo, o que demonstra a importância dessa relação, uma vez que esses micro-organismos auxiliam na captação de nutrientes, e do ponto de vista biotecnológico, podem ser utilizados na busca por novos metabólitos de interesse industrial e comercial (Wang, 2006; Webster *et al.*, 2013).

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DE OCEANO PROFUNDO

1.5.1 Cultivo de micro-organismos de oceano profundo

As condições extremas do oceano profundo podem influenciar diretamente na vida microbiana presente neste local (Zhang, Wu e Zhang, 2017). Devido a isso, uma pequena fração de micro-organismos de oceano profundo pode ser obtida por cultivo, podendo permanecer inativos (dormentes) por longos períodos *in situ* devido inanição, que seria um estado ausente de substratos para seu crescimento, ou outros estresses, sendo necessários incubações específicas, além de condições físicas e químicas ideais para seu desenvolvimento (Deming e Baross 2000; Zhang, Wu e Zhang 2017).

Outros problemas relacionados ao cultivo de micro-organismos de oceano profundo são: (i) Meios de cultura: a concentração e composição dos componentes orgânicos/ inorgânicos podem ser inapropriados, além disso, alguns micro-organismos não são capazes de crescer em meios solidificados; (ii) Condições de cultivo: alguns fatores físico-químicos podem influenciar no crescimento dos organismos, como pressão, temperatura e presença de O₂; (iii) Metodologia usada no isolamento e separação dos isolados: alguns micro-organismos podem crescer de maneira mais lenta e em menor quantidade, enquanto outros em maior quantidade e mais

rapidamente, sendo alguns mais sensíveis ao isolamento, não prosperando, enquanto outros são isolados mais facilmente (Zhang, Wu e Zhang, 2017).

Com intuito de isolar bactérias barófilas e termófilicas, o trabalho de Kato, Nogi e Arakawa (2008) descreveu a utilização de um equipamento específico de isolamento e cultivo, por meio do qual eles conseguiram estudar a comunidade microbiana de sedimento de fossas marinhas japonesas de uma profundidade de 6,292 m durante cultivo sem descompressão, ou seja, sem alterar a pressão dessa amostra, que foi obtida usando um equipamento de coleta de amostras que retém a pressão de 65 MPa e 2°C (Kato, Nogi e Arakawa, 2008).

O trabalho de Takami (1999) foi o primeiro a reportar o isolamento de bactérias de sedimento das fossas Marianas, o que possibilitou entender a relação entre o ambiente e a comunidade microbiana presente nesse local. Foram obtidos centenas de isolados, sendo algumas dessas bactérias produtoras de enzimas como proteases e amilases, bem como bactérias alcalifílicas e termofílicas. Além desses, também foram isolados micro-organismos psicrófilicos, como fungos filamentosos e actinomicetos em 0.1 Mpa. Para o isolamento desses grupos microbianos foram realizadas diferentes formas de cultivo, com a obtenção através do isolamento em meio complexo Marine Broth ou Ágar, suplementado ou não, incubado em temperaturas de 4°C-75°C e condições de pressão atmosférica (0.1 MPa) ou até 100 MPa.

Embora seja difícil o cultivo e isolamento de bactérias de oceano profundo, diversas pesquisas empregaram metodologias adequadas que possibilitam a obtenção desses micro-organismos para um maior conhecimento do papel desempenhado por eles neste ambiente. A utilização de diferentes técnicas, e emprego de dispositivos que auxiliem na manutenção da pressão e baixas temperaturas, entre outras características abióticas, bem como o uso diversos suplementos nutricionais nos meios de cultivo podem ser fundamentais para o desenvolvimento microbiano, possibilitando seu estudo (Takami, 1999; Deming e Boss, 2000; Kato, Nogi e Arakawa, 2008; Zhang, Wu e Zhang, 2017).

1.5.2 Identificação filogenética de micro-organismos de mar profundo

Juntamente com metodologias tradicionais de cultivo e isolamento, há o emprego das ferramentas de bioinformática, como forma de se identificar micro-organismos presentes em oceano profundo, abrangendo ainda mais o conhecimento acerca desses organismos, suas funcionalidades e metabolismos (Ludwig e Schleifer, 1994; Hugenholtz *et al.*, 2021). Nesse sentido, o uso de estratégias polifásicas tem um

papel fundamental no estudo da diversidade e interação dos organismos com o objetivo de caracterizar, classificar e identificar esses micro-organismos por meio de características fenotípicas, mas também genotípicas (Ludwig e Schleifer, 1994).

A identificação de micro-organismos na filogenia utiliza o ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) como marcador filogenético, sendo o ribossomo a molécula ancestral entre os micro-organismos. Ele possui dois componentes que aparentemente funcionam de maneira equivalente, as regiões 18S e 16S rRNA, que são regiões hiperconservadas presentes nos micro-organismos, sendo a subunidade 16S mais comumente utilizada na identificação de bactérias (Fox, Pechman e Woese, 1977), e a região 18S para a identificação de fungos e outros eucariotos (Khaw *et al.*, 2020). A vantagem de se estudar características moleculares é que elas são definidas com precisão, portanto diferentemente de características fenotípicas, um caráter homólogo bacteriano é melhor reconhecido. A nível molecular, a similaridade das sequências encontradas indica um ascendente comum entre os genes e produtos gênicos, agrupando informações similares e seus micro-organismos correspondentes. (Ludwig e Scheifer, 1994).

O trabalho de Lane *et al.* (1985) foi o primeiro a utilizar a subunidade 16S rRNA na caracterização de um micro-organismo por meio da utilização de primers que posteriormente foram chamados de “universais”. Esses primers são utilizados na amplificação da amostra por PCR do gene 16S extraído da amostra ambiental, que passa por um processo de mistura com amplicons clonados nessa reação e são então sequenciados como forma de exibir os perfis da comunidade microbiana presente na amostra. Atualmente essas análises baseadas no sequenciamento do gene 16S são realizadas comparando a amostras de interesse, com aquelas depositadas em bancos de dados disponíveis online (Hugenholtz *et al.*, 2021).

A utilização da identificação filogenética já vem sendo usada em diversos trabalhos ao redor do mundo. Por exemplo, o trabalho de Macisaac *et al.* (2013) utilizou o sequenciamento parcial dos genes 18S e 28S como forma de confirmar a presença de *Telopathes magna*, uma espécie de coral negro em mar profundo do Atlântico Norte (Canadá), descrevendo pela primeira vez um organismo presente em oceano profundo desse local da família Schizophthidae por métodos moleculares. Quanto a micro-organismos, o trabalho de Maruyama *et al.* (2000) descreveu uma nova espécie de *Psychrobacter pacificensis* isolada de fossas japonesas a uma profundidade de 5000-6000 m, por meio da amplificação da subunidade 16S desse isolado. Diversos outros trabalhos

utilizaram as ferramentas de sequenciamento e bioinformática na identificação de micro-organismos por métodos independentes de cultivo, como o trabalho de Gutierrez e colaboradores (2015), que fizeram a caracterização de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos presentes em sedimento da Bacia Guayamas, Califórnia, em uma profundidade de 2007 m.

Portanto, embora sejam associações muito interessantes no âmbito da pesquisa científica, a obtenção e a identificação de micro-organismos de oceano profundo advindos de corais e esponjas ainda enfrentam algumas barreiras, como as condições de cultivo dessas amostras com as técnicas tradicionais de cultivo, uma vez que algumas características desse ambiente, como as baixas temperaturas, pressão hidrostática, ausência de luz, concentração de nutrientes podem influenciar no cultivo desses micro-organismos (Zhang, Wu e Zhang, 2017). Por isso, é importante a busca por metodologias que possam promover o crescimento desses micro-organismos trazendo um maior conhecimento acerca de sua diversidade, função na simbiose e potenciais utilizações biotecnológicas, sendo esses micro-organismos muitas vezes identificados utilizando-se somente ferramentas de bioinformática por meio da utilização de biomarcadores taxonômicos como as subunidades gênicas 16S e 18S rRNA (Nawaz *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

As regiões de oceano profundo são interessantes para potenciais descobertas na área de pesquisas ambientais e microbiológicas, devido às suas características abióticas únicas, com a necessidade de mais estudos voltados para esses ambientes e seu microbioma associado (Jannasch e Taylor, 1984; Costello e Chaudhary, 2017; Acinas *et al.*, 2019). Sabe-se que as ações humanas, tais como desflorestamento, pesca extensiva, emissão de gases fósseis, dentre outros fatores são capazes de afetar os oceanos de maneira ativa (Knowlton, 2001), onde os ecossistemas marinhos sofrem fortes ameaças diante desses estresses. De forma mais específica, os ecossistemas recifais de oceano profundo sofrem com impactos da ação antrópica, como por exemplo, a exploração de petróleo, que gera contaminação por hidrocarbonetos (Demopoulos *et al.*, 2016); o acúmulo de CO₂ pelos mares, gerando acidificação desses ambientes (Gómez *et al.*, 2018); atividades ilegais de pesca de arrasto, que impactam profundamente a diversidade biológica local (Pham *et al.*, 2014); e o acúmulo de microplásticos e outros poluentes tóxicos (Liao *et al.*, 2021; Sanganyado *et al.*, 2021). Os ecossistemas de oceano profundo

são complexos, e formados principalmente pela associação entre diversas espécies de corais (Cnidaria), além de serem encontradas muitas espécies de esponjas (Porifera), equinodermos, dentre outros animais associados (Roberts *et al.*, 2006). O oceano profundo, seus organismos, e seus micro-organismos associados possuem papel-chave nos ciclos biogeoquímicos, nas constituições biogeográficas, além de serem refúgio para inúmeras espécies marinhas (Roberts *et al.*, 2006; Wang, Meng e Wang, 2020).

Os corais e esponjas são ditos holobiontes, uma vez que estabelecem uma associação simbiótica com uma grande diversidade de micro-organismos fundamental para a vida e manutenção da saúde desses organismos (Bosch *et al.*, 2011; Pogoreutz *et al.*, 2020). Esses micro-organismos são capazes de captar nutrientes essenciais ao hospedeiro, além de estarem inseridos em um ambiente ainda pouco explorado. O oceano profundo se caracteriza por ter somente cerca de 16% das espécies de (macro) organismos conhecidas e descritas na literatura (Costello e Chaudhary, 2017), despertando um interesse da comunidade científica na busca de novos (micro) organismos que podem apresentar potencial biotecnológico (Jannasch e Taylor, 1984; Thompson *et al.*, 2018). Já se sabe que a associação entre micro-organismos e corais e esponjas são muito importantes para a vida desses organismos de mar profundo, uma vez que os micro-organismos são capazes de ajudar seus hospedeiros na captação de nutrientes além de auxiliarem na defesa e saúde desses animais e no transporte de metabólitos que são importantes para sua viabilidade nesse ambiente (Webster *et al.*, 2013). Sendo assim, micro-organismos encontrados no ambiente de oceano profundo, como bactérias, vírus e fungos podem desempenhar importantes funções em sua associação com esses animais (Wang *et al.*, 2020; González e Whitman, 2006; Tortorella *et al.*, 2018; Ohmae *et al.*, 2015). Dessa forma, destaca-se a necessidade de estudos mais detalhados acerca da biodiversidade e potenciais biotecnológicos dos micro-organismos no oceano profundo, que podem ser utilizados para a obtenção de compostos bioativos e de bioprospecção, para a aplicação industrial e terapêutica (Thompson *et al.* 2018; Modolon *et al.* 2020).

O estudo da associação micro-organismo-hospedeiro em oceano profundo é importante no âmbito da pesquisa, porém limitado devido a necessidade de meios seletivos e específicos que podem ajudar no isolamento, crescimento e enriquecimento das amostras advindas de oceano profundo (Jannasch e Taylor, 1984).

Como forma de compreender melhor este ambiente, este trabalho tem como finalidade investigar e identificar os micro-organismos de recifes de coral de oceano

profundo, isolados de amostras de corais, esponjas, água e sedimento, coletadas na Bacia de Campos durante a expedição oceanográfica PROBIO-DEEP, de 600 a 800 metros de profundidade. Para tal, foram utilizadas técnicas de microbiologia tradicional, como o cultivo e o isolamento em meios seletivos, para posterior identificação e classificação taxonômica dos isolados obtidos por métodos de biologia molecular.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho é realizar uma busca por micro-organismos cultiváveis em meios generalistas e seletivos, a partir de amostras coletadas em recifes de coral de oceano profundo (corais, esponjas, água e sedimento) e investigar taxonomicamente essas amostras por meio de cultivo microbiano e de biologia molecular.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Coletar amostras de corais e esponjas de oceano profundo, além de água e sedimento afim de se obter seus micro-organismos associados;
2. Isolar micro-organismos de oceano profundo utilizando-se 16 diferentes meios de cultura (generalistas e seletivos) a partir de amostras de coral, esponjas, água e sedimento;
3. Identificar por meio de ferramentas de bioinformática os micro-organismos presentes nessas amostras;
4. Construir a árvore filogenética dos micro-organismos para avaliar as relações evolutivas dos micro-organismos em cada tipo de amostra;
5. Correlacionar os dados taxonômicos dos isolados microbianos de cada amostra e meios utilizados.

5 METODOLOGIA

5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de coral, esponjas, água e de sedimento de oceano profundo

utilizadas nesse trabalho foram coletadas da Bacia de Campos, situada no Estado do Rio de Janeiro, entre os meses de Agosto e Setembro de 2021 e fazem parte do projeto PROBIO-DEEP coordenado pela Prof. Raquel Peixoto e pela Prof. Flávia do Carmo e financiado pela Shell Brasil (ANP).

As amostras foram coletadas durante 10 dias de expedição a bordo do navio Aquarios (Fugro) em diferentes pontos de coleta (Ponto 1A e 1B, 2, 3 4 e 5) como mostrado na **Figura 4** entre 600 e 800 metros de profundidade. Após passarem por uma triagem inicial, as amostras foram semeadas em meios de cultura distintos, (descritos nos tópicos abaixo) utilizando-se técnicas tradicionais para o cultivo microbiano. Todos os isolados fazem parte do banco de amostras mantido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular - LEMM, localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

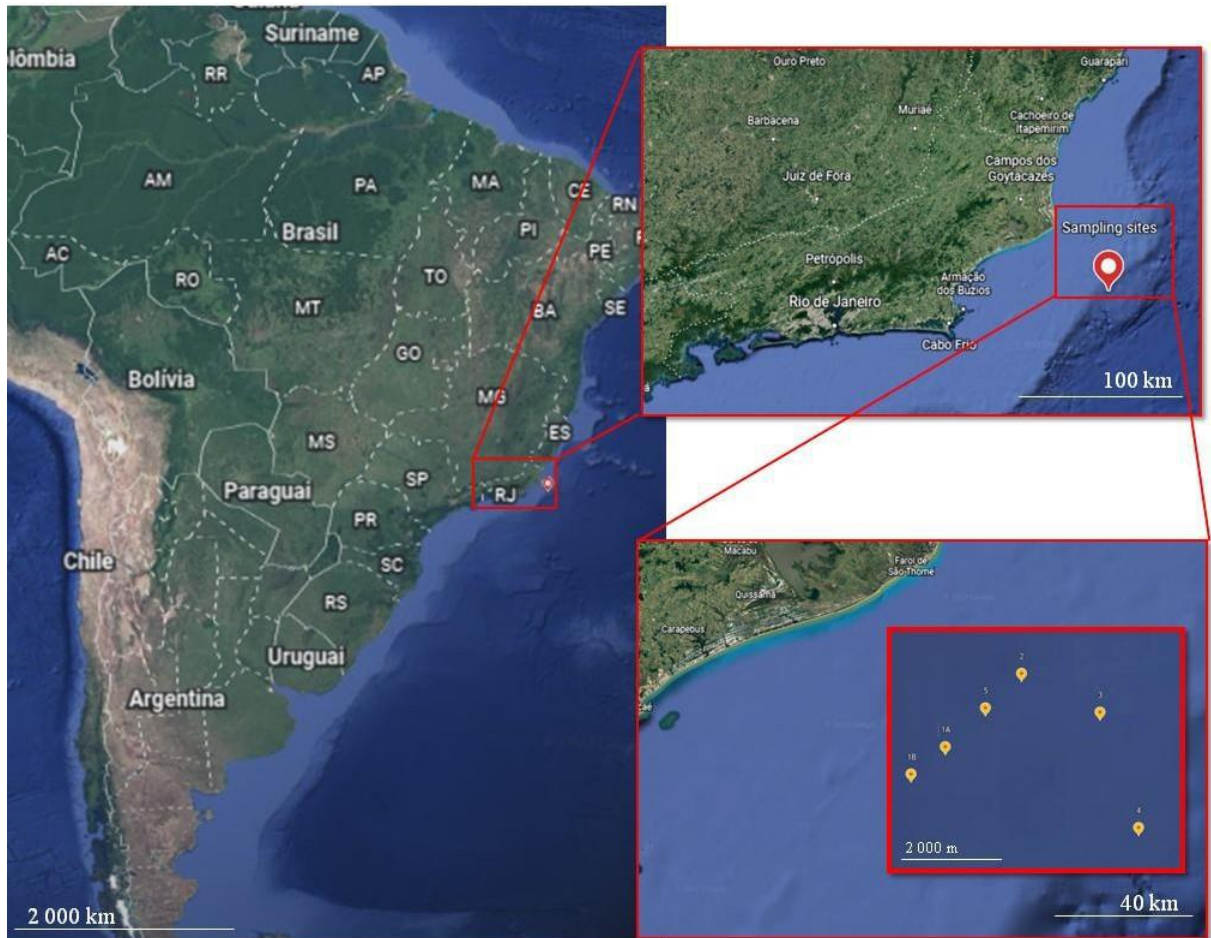


Figura 4 Local de coleta de amostras da expedição PROBIO-DEEP. As coletas de amostras foram realizadas em profundidades de 600-800m, na Bacia de Campos localizada no Rio de Janeiro, Brasil.

Para as amostras de corais e esponjas, foi utilizado um veículo marinho operado remotamente (*ROV*), adaptado com uma grande gaveta, que se fechava na profundidade de coleta, evitando a mistura da amostra com água de outras profundidades. O *ROV* (Fugro©) coletava delicadamente as amostras com suas garras, e as colocava na gaveta, que era trazida a bordo. A coleta de água do mar foi feita com o uso de Garrafas Go-Flo (General Oceanics©), comumente utilizada na coleta de água marinha em diversas profundidades. A Go-Flo era fechada mecanicamente com as garras do *ROV* próximo aos recifes onde as amostras de corais e esponjas foram coletadas. Para as amostras de sedimento, foi utilizado um Box-corer (feito sob encomenda pelo projeto), lançado próximo ao recife de coral, com o objetivo de entender melhor a comunidade microbiana presente naquele local (**Figura 5**).

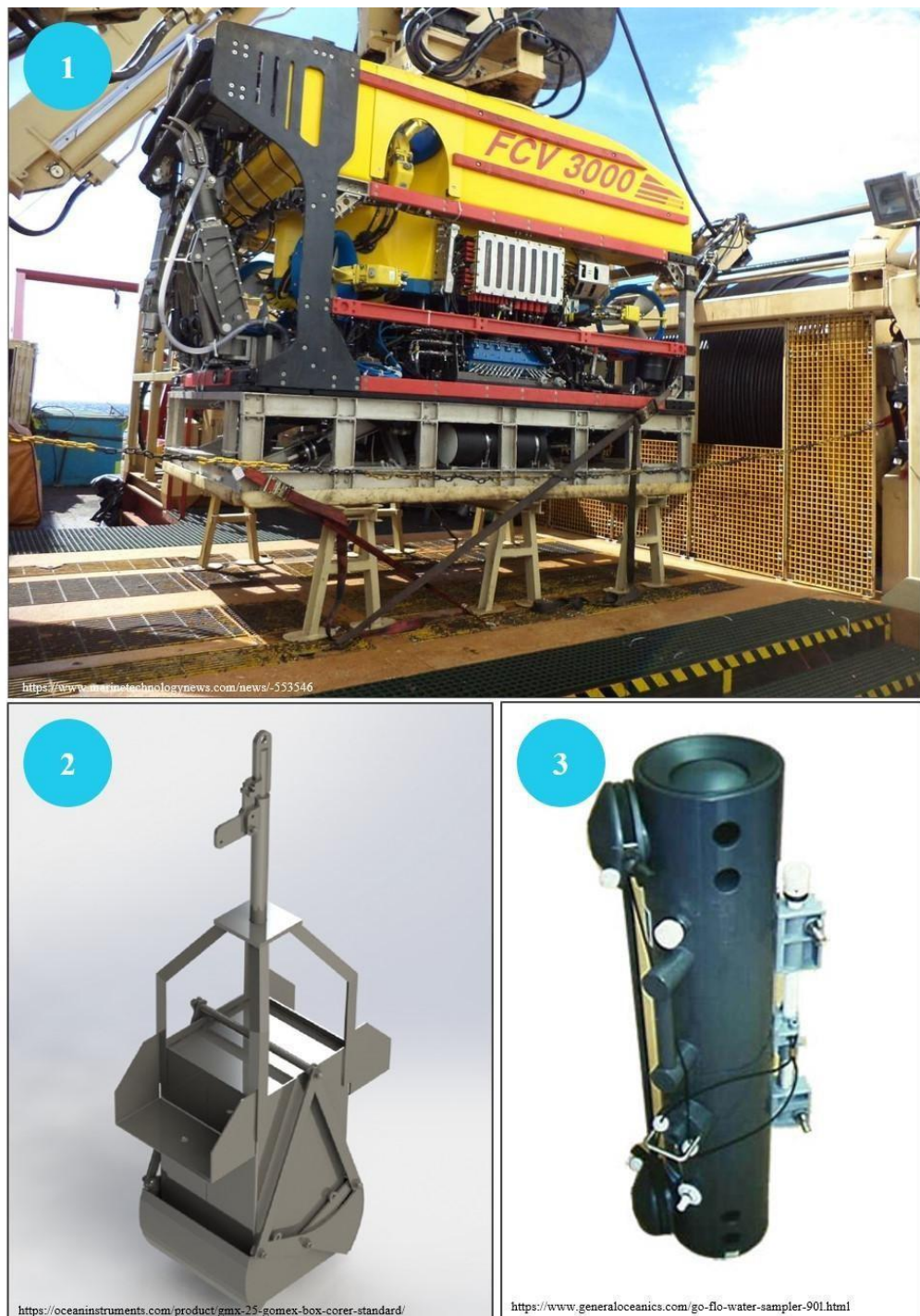


Figura 5 Equipamentos de coleta de oceano profundo. (1) Veículo Remotamente Operado (ROV) (Fugro©) adaptado com uma gaveta compartimentalizada para a coleta dos animais. (2) Box-corer (fabricado sob encomenda para o projeto) utilizado para a coleta de sedimento. (3) Garrafas Go-flo (General Oceanics©) para a coleta de água.

Após a coleta, as amostras seguiram um protocolo de triagem e de plaqueamento em meios generalistas e seletivos como mostrado na Figura 6, onde é mostrado além das metodologias seguidas em navio, as metodologias seguidas em laboratório após o término da

expedição, que se deu pelo isolamento dos micro-organismos crescidos nos meios de cultura, a anotação de suas características morfológicas e extração de DNA dos isolados para identificação por meio do *Ribosomal Data Base Project*.

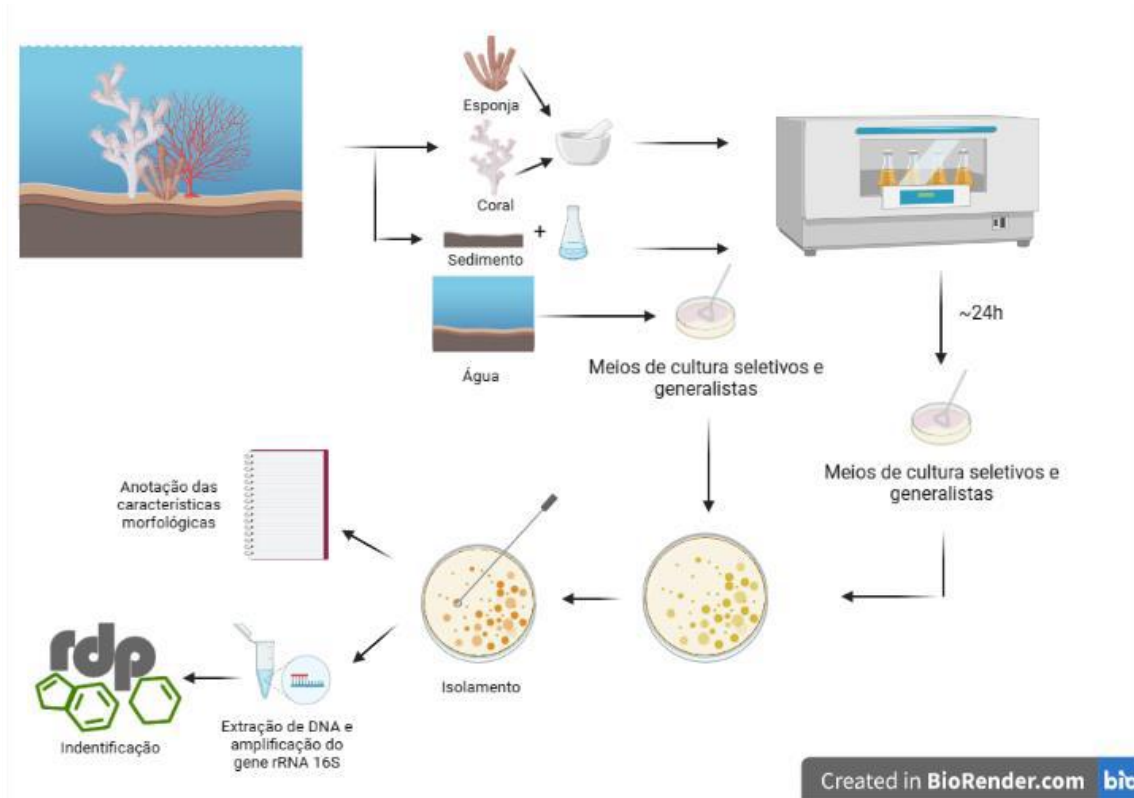


Figura 6 Fluxograma das metodologias seguidas. (Fonte: Autor)

5.3 PLAQUEAMENTO E MEIOS DE CULTURA

As amostras de coral, esponjas, sedimento e água coletadas em cada ponto foram imediatamente processadas para o cultivo dos micro-organismos ainda no navio. Foram selecionadas amostras de acordo com a espécie de organismos coletados e pontos de coleta, que passaram por um processamento que consistiu em: maceração das amostras em fluxo laminar, com auxílio de um cadinho e pistilo previamente esterilizados com álcool 70% e UV por 30 min; colocação do conteúdo em um Erlenmeyer contendo 50g de pérolas de vidro e 50 ml de salina 0,85% NaCl estéril e agitação do frasco a 6° C por 24 horas a 100 rpm. Esse conteúdo foi então plaqueado nos diferentes meios de cultura, como descritos abaixo na Tabela 1. As amostras da água do mar profundo também foram inoculadas em meios de cultura, mas não passaram pelo processamento de agitação com pérolas de vidro, sendo plaqueadas imediatamente nos meios de cultura correspondentes, sem diluição e sem concentração. Para as amostras de sedimento, aproximadamente 10g de sedimento foi colocado em Erlenmeyer contendo 50g de pérolas de vidro e 50 ml de salina 0,85% NaCl estéril e colocado em agitação por aproximadamente 24 horas a 100 rpm.

Tabela 1. Meios de cultura, processamento e condições de incubação utilizadas para o isolamento de micro-organismos de mar profundo.

Nº	Meio de Cultivo	Objetivo de Isolamento	Amostra*	Diluições	Temp (°C)	Incub ***	Nº placas
1	MetM	Metanotróficas	C, E, SD, A	0	6	Aer	16
2	MB20	Seletivo para bactérias de esponjas	E	0,-1,-2,-3,-4	6	Aer, An	60
3	Marine Minimal Medium (MMM) + carboidratos específicos	Seletivo para degradação de fucose e arabinose	E	0,-1	6	Aer, An	24
4	MMM + hidrocarbonetos (filtro de papel)	Seletivo para degradadores de hidrocarbonetos	C, E, Sd, A	0	6	Aer	48

5	BH + óleo (fração insolúvel)	Seletivo para degradadores de hidrocarbonetos	C, E, Sd, A	0	6	Aer	48
6	BH + óleo (fração solúvel)	Seletivo para degradadores de hidrocarbonetos	C, E, Sd, A	0	6	Aer	48
7	Medium A (caldo e ágar)	Enriquecimento para nitrificantes	C, E	0	6	Aer	12
8	TCBS	Seletivo para vibrios	C, A	0, -1	6/2 6	Aer	24
9	R2A	Bactérias generalistas	C	0, -1, -2, -3, -4	6/2 6	Aer	60
10	MA	Bactérias generalistas	C	0, -1, -2, -3, -4	6/2 6	Aer	60
11	MA 1/2	Bactérias generalistas	C	0, -1, -2, -3, -4	6/2 6	Aer	60
12	MMM + Coral juice	Meio mínimo parabactérias generalistas de coral	C	0, -1, -2, -3	6	Aer	24
13	Ammonia-oxidizer medium	Oxidantes de amônia	C, E, Sd, A	0, -1	6	Aer	32
14	K medium + Metanol	Metilotróficas	C, E, Sd, A	0, -1	6	Aer	32
15	SOB	Seletiva para bactérias oxidantes de sulfetos autotróficas	C, E	0, -1, -2	6/2 6	Aer	108

16	SOB + Glicose	Seletiva para bactérias oxidantesde sulfetos heterotróficas	C, E	0,-1,-2	6/26	Aer	108
----	---------------	---	------	---------	------	-----	-----

*Abreviações das amostras: C = coral; E = esponja; Sd = sedimento; A = água.

***Abreviação das condições de incubação: Aer = aeróbica; An = anaeróbica.

1. Para o isolamento de bactérias metanotróficas, foi utilizado meio *Methanotrophic medium* (MetM) em amostras de coral, esponja, sedimento e água de acordo com o que descreve o protocolo de Lindstrom et al. (1988). Um total de 0,5ml das amostras foram inoculados em meio de cultura líquidos com o auxílio de uma seringa nos meios de incubação em anaerobiose, e enquanto para a obtenção de aeróbios, foi inoculado a mesma quantidade como auxílio de uma pipeta automática. O metano foi adicionado posteriormente no *headspace*, complementando as condições ideais de oxigênio: metano para os tubos em anaerobiose, sendo os frascos incubados a 6°C.

2. Para o isolamento de bactérias de esponjas, o meio utilizado foi o MB20 seguindo o protocolo de Esteves et al. (2016), onde 100µl da amostra foi disposta na placa contendo o meio com o auxílio da alça de Drigalski, sendo incubadas a 6°C em condições aeróbias e anaeróbias até que fosse observado crescimento.

3. Com intuito de se obter bactérias seletivas degradadoras de hidrocarbonetos, foi utilizado o meio MMM + hidrocarbonetos em amostras de coral, esponjas, sedimento e água onde 100µl de cada amostra foi colocado na placa e espalhado com auxílio da alça de Drigalski, sendo as placas incubadas a 6°C até que fosse observado crescimento.

4. Com intuito de se obter bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, foi preparado o meio *Bushnell and Hass* (BH) com adição de óleo (insolúvel e solúvel), onde 100µl do conteúdo macerado foi disposto no meio com auxílio da alça de Drigalski, e as placas foram incubadas a 6° C e 26° C até que fosse observado seu crescimento.

5. Para isolar e caracterizar bactérias nitrificantes, o meio utilizado foi o Meio A líquido, seguindo-se o protocolo descrito por Pillay et al. (1989), com o inóculo de 100µl da amostra, que foi incubada a 6 °C até que fosse observado seu crescimento. 6. Com intuito de se isolar *Vibrio* de coral e água uma alíquota de 100µl de amostra foi disposta com o auxílio da alça de Drigalski sobre a placa contendo meio de cultivo TCBS e incubadas a 6°C e 26°C em

aerobiose até que fosse observado seu crescimento.

7. Para isolamento de bactérias generalistas foram utilizados os meios R2A, MA e MA ½ e MMM + Coral juice (Schultz e Modolon (in prep.), onde 100µl do conteúdo macerado foi disposto sobre as placas com o auxílio da alça de Drigalski, e incubados a 6°C e 26°C até que se pudesse observar crescimento.

8. Para isolar bactérias oxidantes de amônia das amostras foi utilizado *Ammonia-oxidizer medium*, como descreve o protocolo de Fujitami et al. (2015), onde 100µl das amostras desejadas foram adicionadas ao meio de cultura e os frascos incubados a 6°C até que pudesse ser observado desenvolvimento.

9. Para o isolamento de bactérias metilotróficas foi utilizado K medium + Metanol, como descreve o protocolo de Kaparullina et al. (2018), onde tubos com o meio foram inoculados com 100µl das amostras desejadas, e incubados a 6°C. Quando observado a turbidez no meio líquido, uma alíquota foi usada para subcultivo em placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura com a adição de metanol com um disco de filtro impregnado com 250 µl de metanol.

10. Com intuito de isolamento de bactérias oxidantes de sulfeto (descrito na tabela como SOB), foi utilizado o meio *Thiosulphate Agar* com e sem glicose (para a obtenção de micro-organismos heterotróficos e autotróficos, respectivamente), como descreve o protocolo de Vidyalakshmi e Sridar (2007), onde 100 µl do conteúdo macerado foi disposto sobre as placas com o auxílio da alça de Drigalski, e incubados a 6°C e 26°C até que se pudesse observar o desenvolvimento bacteriano.

Após observação de crescimento do plaqueamento em meio de cultivo sólido, as colônias bacterianas com diferentes morfotipos foram semeadas em meio correspondente como forma de obter-se o isolamento. Após observado seu crescimento de forma pura, cada isolado foi crescido em meio MA 50%, que possibilitou o crescimento de todos os isolados. Após o crescimento, cada isolado foi preservado em glicerol 20% em ultrafreezer a -80°C.

5.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos foram previamente crescidos em meio de cultivo líquido MA50% (Marine Ágar diluído 50%) sob agitação de 100 rpm por 48 horas. Este conteúdo foi centrifugado (14.000 g, 2 min, 4°C) e o sobrenadante descartado sendo o *pellet* usado para extração de DNA genômico usando o Kit de extração e purificação *Wizard*®

Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison USA) de acordo com as recomendações da fabricante. As amostras extraídas foram purificadas com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, United Kingdom). A qualidade e quantificação da extração de DNA foi feita por meio do equipamento NanoDrop™, posteriormente as amostras foram enviadas para sequenciamento do gene rRNA 16S, utilizando-se os primers 27 f (5'-CGT GCC AGC AGC CGC GGT AA-3') e 1492r (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se a plataforma *Sanger Pipeline* do *Ribosomal Database Project* (RDP) para identificação dos micro-organismos cultivados, e BLASTn das potenciais novas espécies. Após isso, foi construída a árvore filogenética dos isolados para uma avaliação da relação evolutiva entre eles, com a utilização do software MEGA X (Kumar et al. 2018; Stecher, Tamura e Kumar, 2020) e utilizando as sequências referências do banco de dados RDP para comparação filogenética.

6 RESULTADOS

6.1 ISOLAMENTO E TAXONOMIA DOS MICRO-ORGANISMOS

O uso da microbiologia tradicional, com o cultivo de micro-organismos em diferentes meios de cultura possibilitou o isolamento de um total de 286 morfotipos (**Figura 7**) microbianos, classificados nos 4 maiores filos do Reino Bacteria. Pode-se observar que o filo que apresentou maior abundância foi o de Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Adicionalmente, os resultados demonstraram que isolados microbianos foram distribuídos em 37 gêneros, com *Pseudoalteromonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio* e *Photobacterium* predominantes nas amostras de oceano profundo (**Figura 8**).

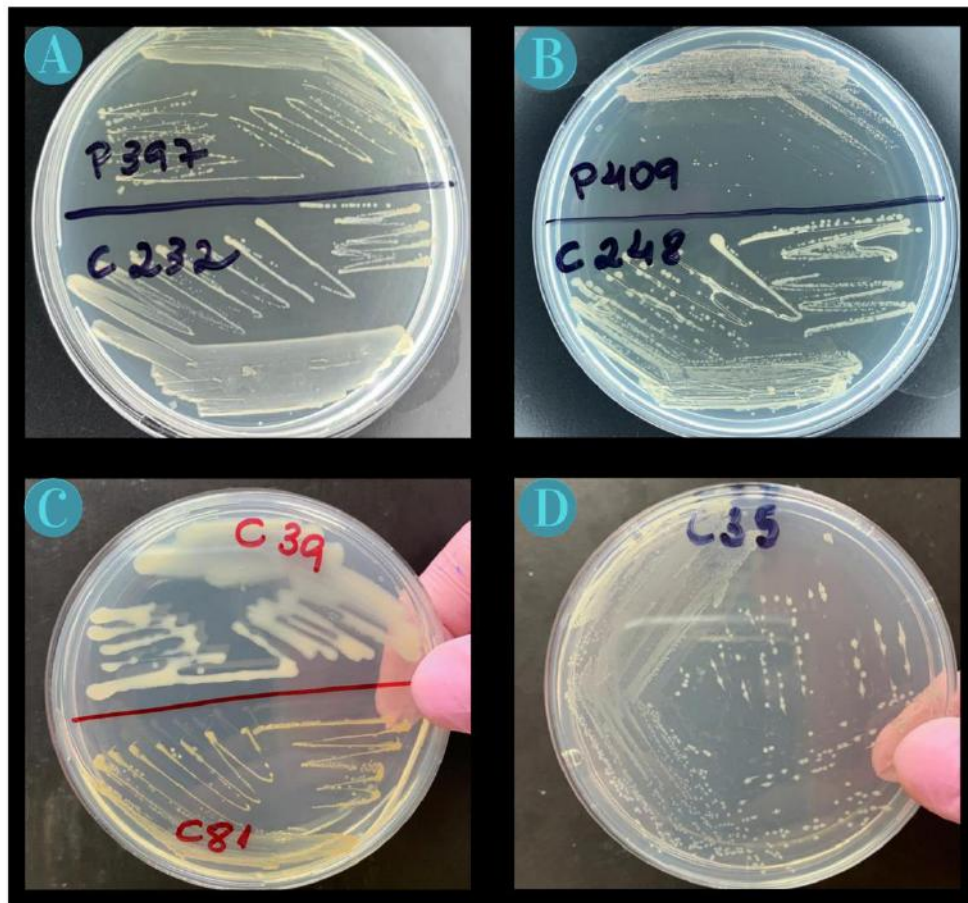


Figura 7 Exemplos de morfologias encontradas em isolados de (A) esponja e coral, (B) esponja e coral, (C) coral, (D) coral. (Fonte: Autor)

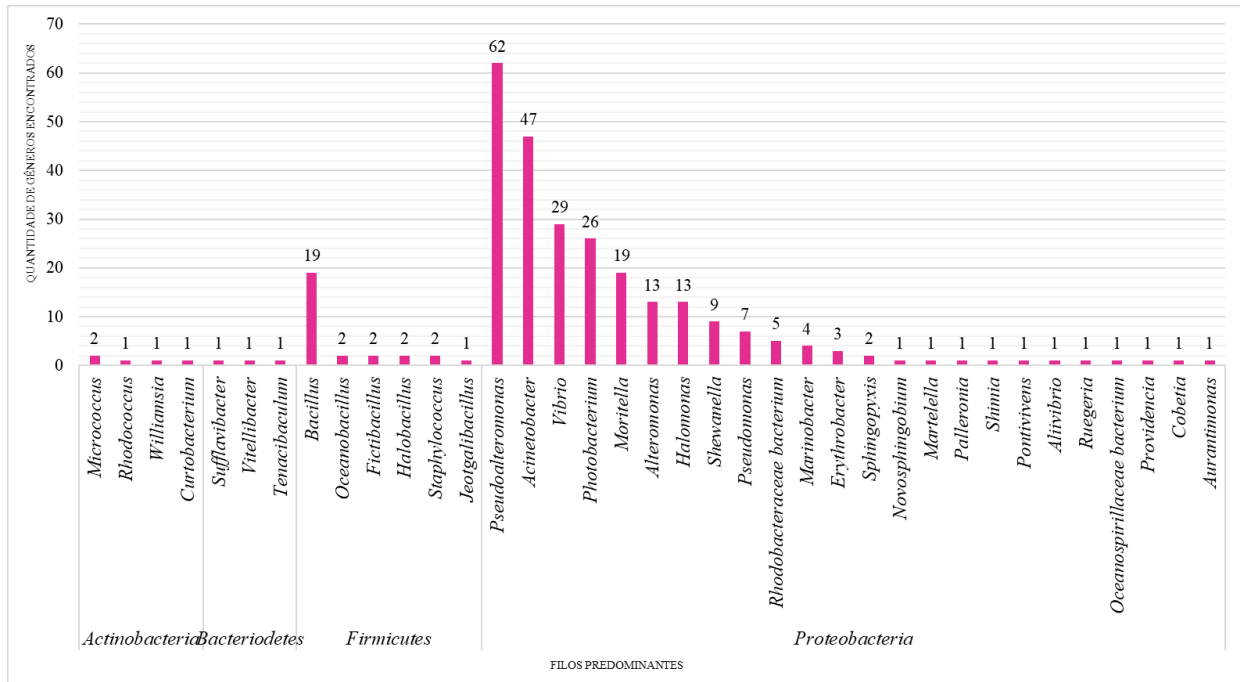


Figura 8 Número absoluto e identificação taxonômica a nível de gênero dos isolados obtidos dentro dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria.

6.1.1 Relação de gêneros encontrados por meios de cultura

Para a obtenção de uma maior diversidade microbiana possível, foram utilizados 16 meios de cultura distintos para o cultivo e posterior isolamento microbiano. Após o crescimento e isolamento, foi possível obter isolados microbianos com diferentes características morfológicas coloniais, demonstrando que o emprego de diferentes meios de cultura para o cultivo microbiano pode ser capaz de fornecer maior conhecimento acerca da diversidade microbiana do oceano profundo (**Figura 9**). A figura 9 demonstra que o gênero *Pseudoalteromonas* foi o que se mostrou mais abundante nos meios utilizados, se desenvolvendo na maioria deles, tanto nos meios generalistas como nos meios seletivos para metabolismos microbianos. Além dele, *Acinetobacter* e *Vibrio* também foram capazes de se desenvolver em uma grande variedade de meios de cultura, indicando uma plasticidade genotípica nesses grupos bacterianos e pouca exigência nutricional.

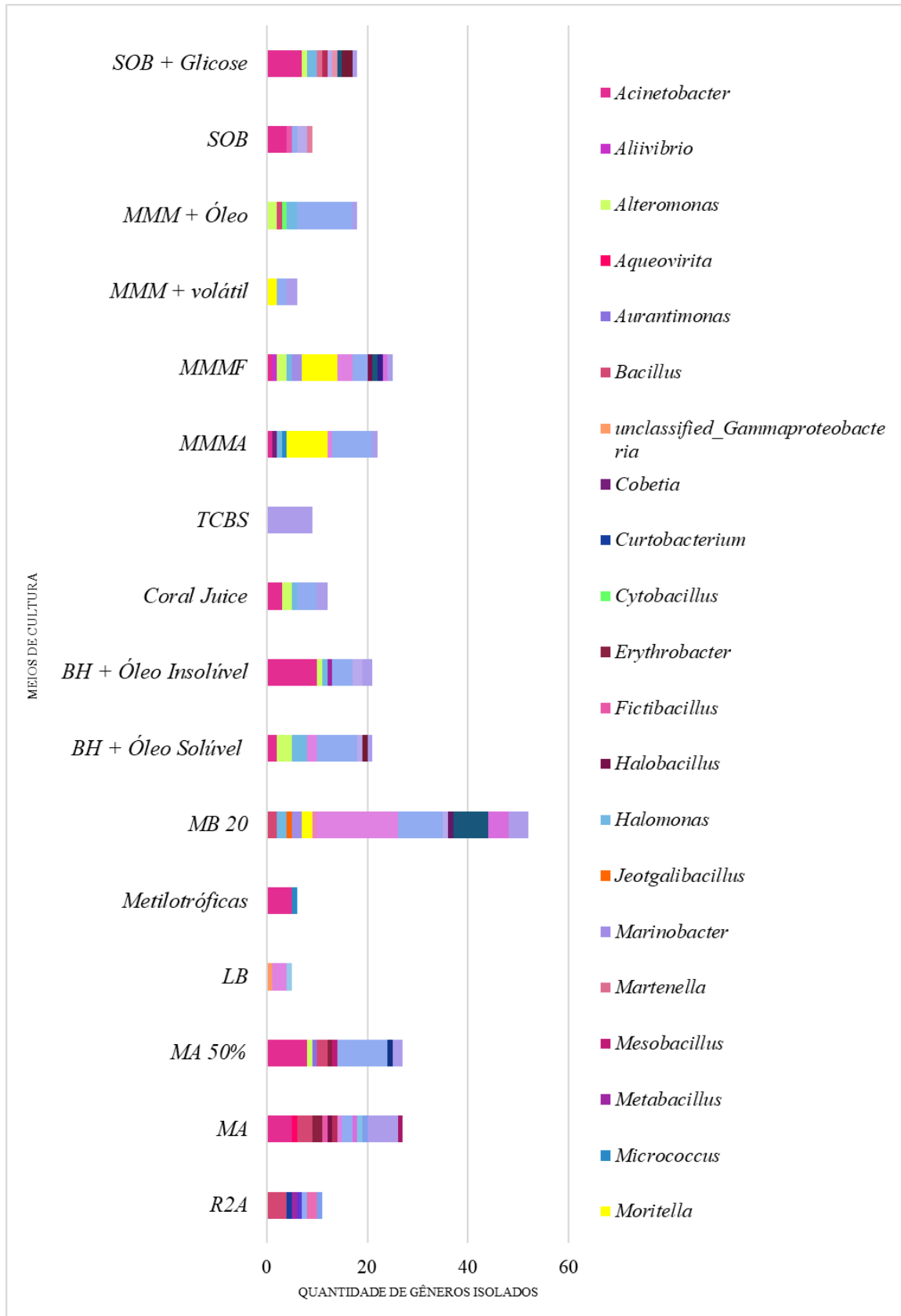


Figura 9 Relação da diversidade microbiana obtida em todos os meios de cultura utilizados para o isolamento dos micro-organismos.

Os meios para o cultivo e seleção de micro-organismos com metabolismos

específicos, foram utilizados para a seleção de grupos microbianos específicos dentre os generalistas. A **figura 10** permite uma visualização mais aprofundada da diversidade microbiana que foi obtida a partir do uso de meios seletivos. Pode-se observar que o gênero *Moritella*, obtido a partir de amostras de esponjas, foi recuperado em diferentes meios seletivos, não sendo possível sua obtenção nos meios generalistas, com a metodologia empregada neste trabalho. Ainda, bactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Shewanella* também só foram obtidas de meios seletivos, o que demonstra a importância de utilizar os mais diversos meios de cultura com intuito de se obter maior diversidade microbiana, refletindo de forma mais realista o que se pode encontrar no ambiente natural.

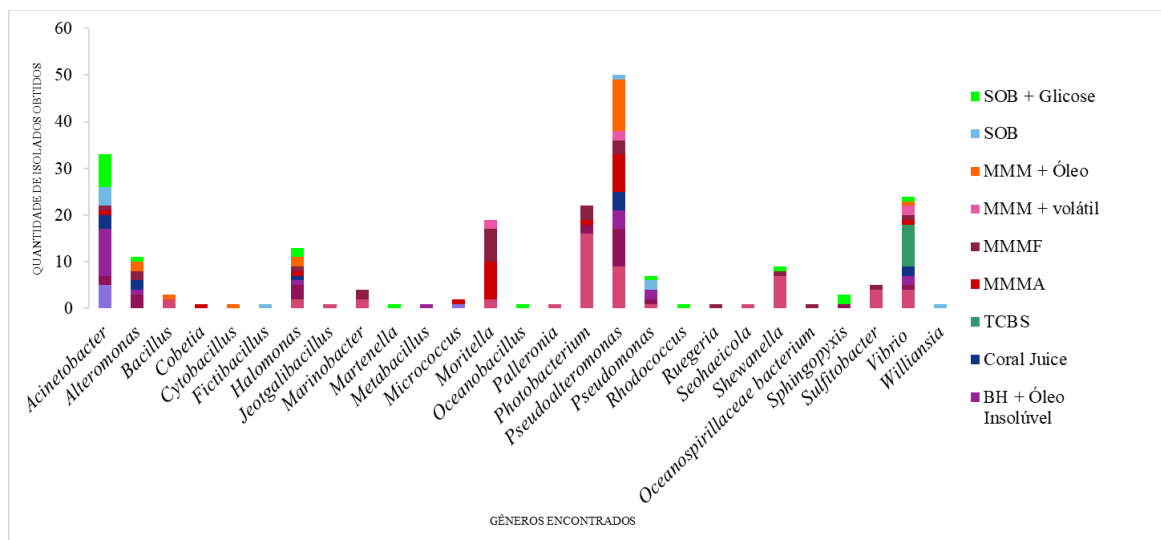


Figura 10 Relação entre a diversidade microbiana encontrada e os meios seletivos utilizados no isolamento microbiano.

Os meios generalistas, que foram aqueles utilizados para o cultivo de micro-organismos “gerais”, ou seja, os que não selecionam micro-organismos por componentes específicos do meio, mas permitem o crescimento por serem relativamente ricos, também foram importantes para o isolamento de diversos gêneros microbianos. Com a utilização desses meios, foi possível obter principalmente a classe Bacilli, bem como isolados dos gêneros *Erythrobacter*, *Vitellibacter* e *Aurantimonas* que foram isolados a partir dos meios generalistas (**Figura 11**).

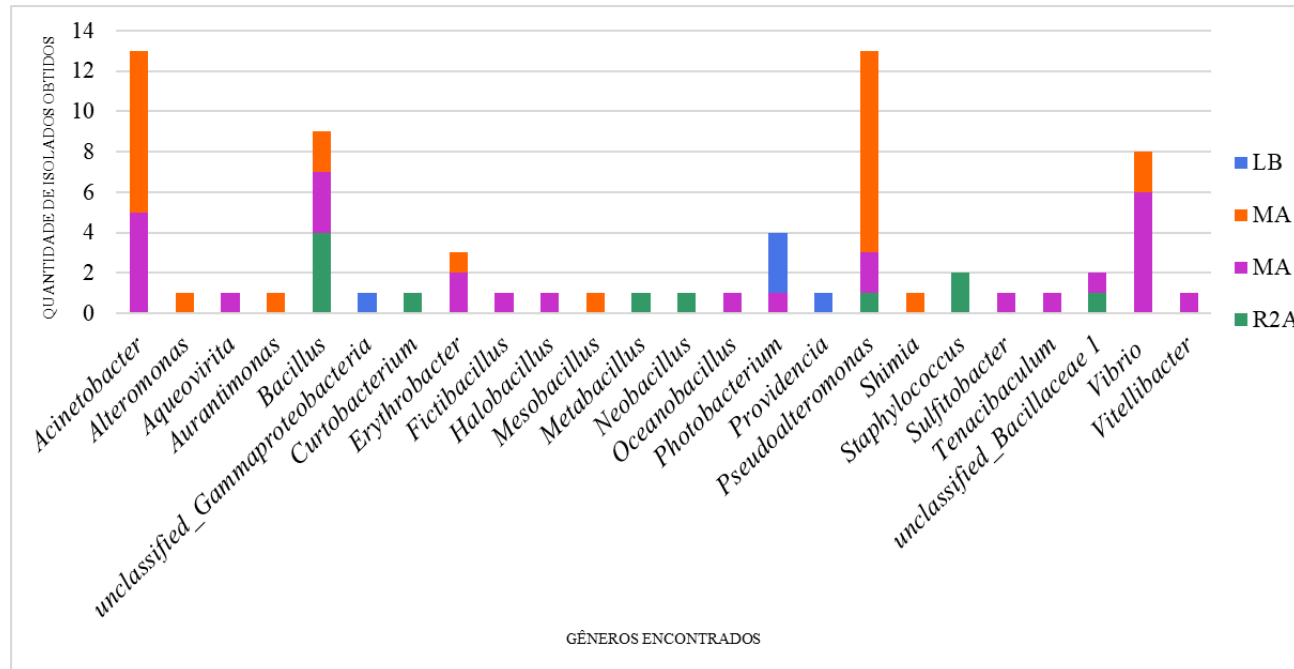


Figura 11 Relação entre a diversidade microbiana e os meios de cultivo generalistas utilizados no isolamento microbiano.

Diferentes grupos microbianos foram isolados das diferentes fontes utilizadas nesse trabalho: corais, esponjas, água e sedimento de oceano profundo. Pode-se observar que o gênero *Pseudoalteromonas* foi o mais abundante nas amostras de coral e esponja. Nos corais, o gênero *Acinetobacter* e *Vibrio* também se mostraram abundantes, correspondendo a 23% e 16% respectivamente. O gênero *Bacillus* também apresentou abundância nos isolados de coral, com 11 isolados representantes (**Figura 12**).

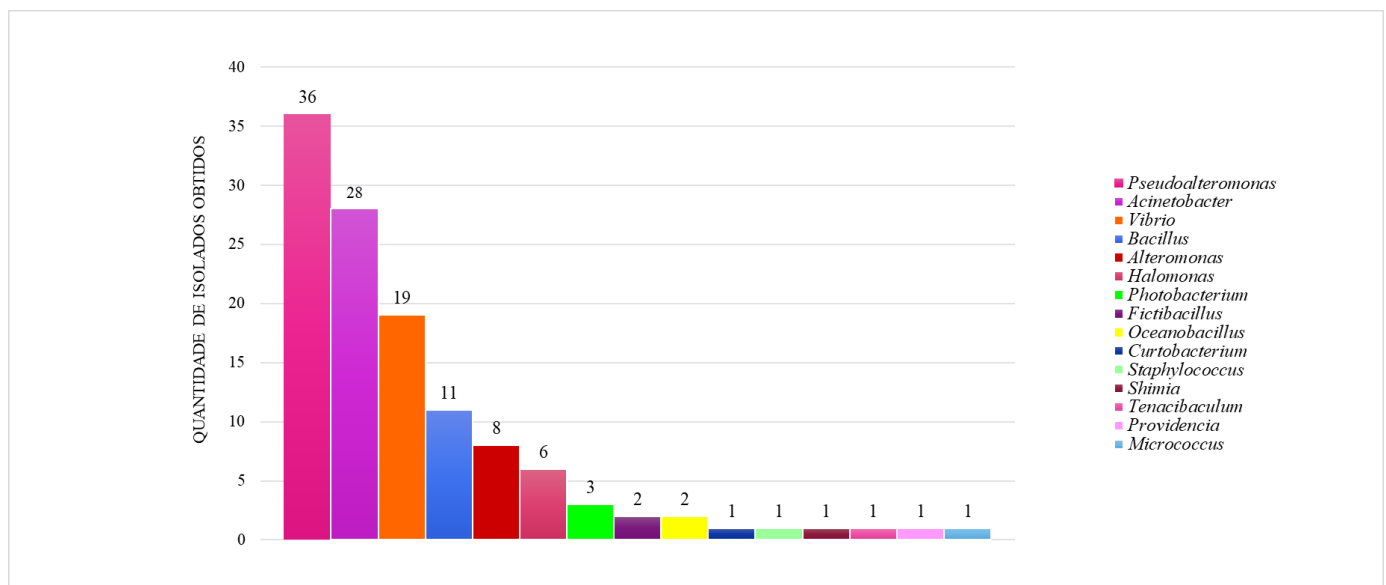


Figura 12 Relação de gêneros encontrados em amostras de coral de oceano profundo.

Nas amostras de esponja, além de *Pseudoalteromonas*, o gênero *Photobacterium* também foi dominante entre os isolados obtidos, com 22 isolados (15.9%). Ainda, *Moritella*

e *Acinetobacter* também foram gêneros bacterianos abundantes, com 13% e 10.8% de predominância, respectivamente (**Figura 13**).

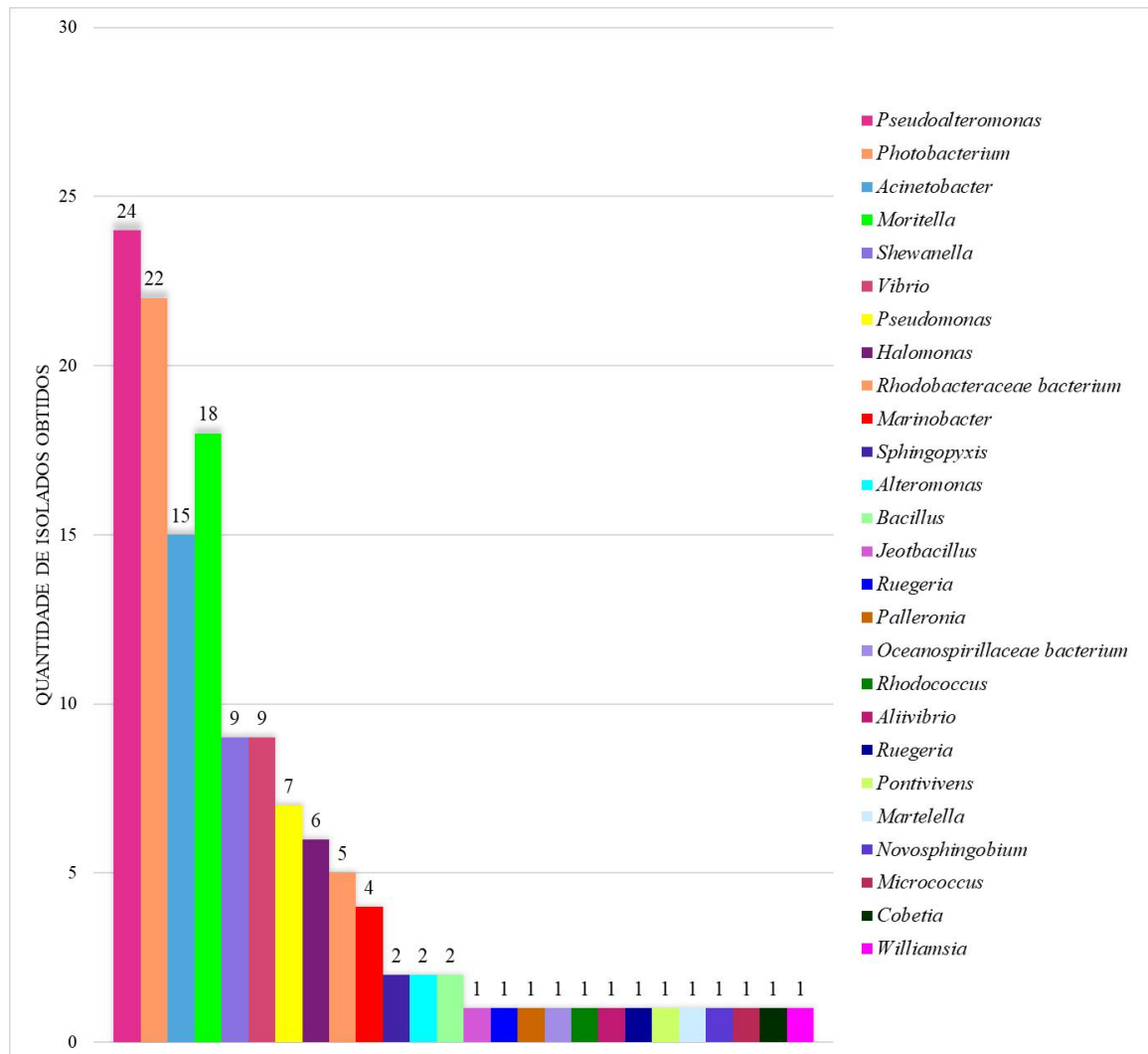


Figura 13 Relação de gêneros encontrados em amostras de esponjas de oceano profundo.

A partir das amostras de esponjas, foi realizada a incubação anaeróbia, com a obtenção de 14 gêneros bacterianos, totalizando 37 isolados anaeróbios, dentre eles, *Photobacterium* sp. foi o gênero predominante, com 9 isolados, seguido de *Pseudoalteromonas* sp. (7) e *Vibrio* sp. (5) (**Figura 14**).

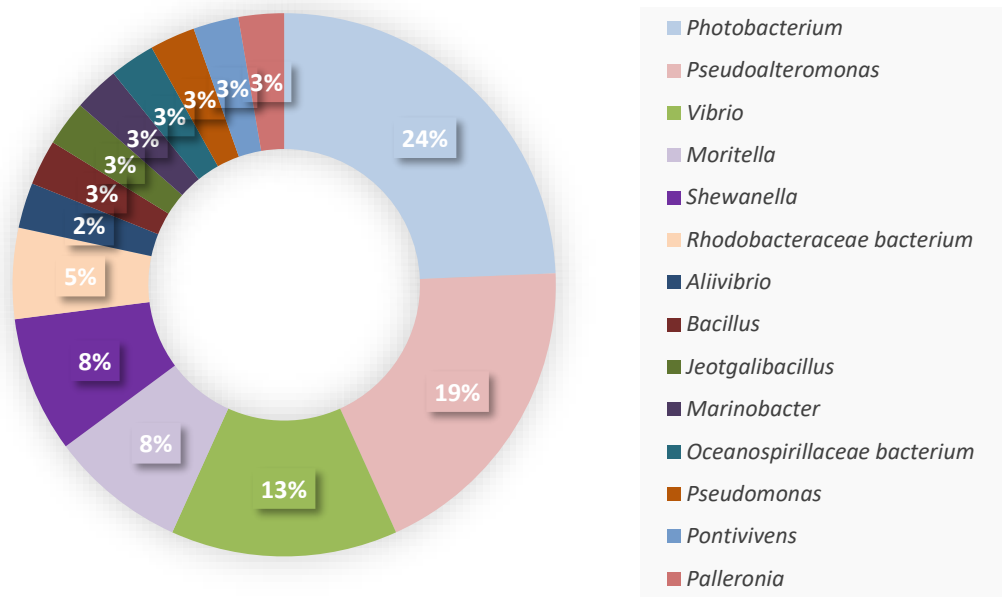


Figura 14 Relação de gêneros anaeróbios isolados de amostras de esponjas de oceano profundo.

Nas amostras de água de oceano profundo foram encontrados os gêneros *Bacillus* (23%), seguido de *Pseudoalteromonas* (18%) e *Erythrobacter* (17%) como gêneros predominantes (**Figura 15**).

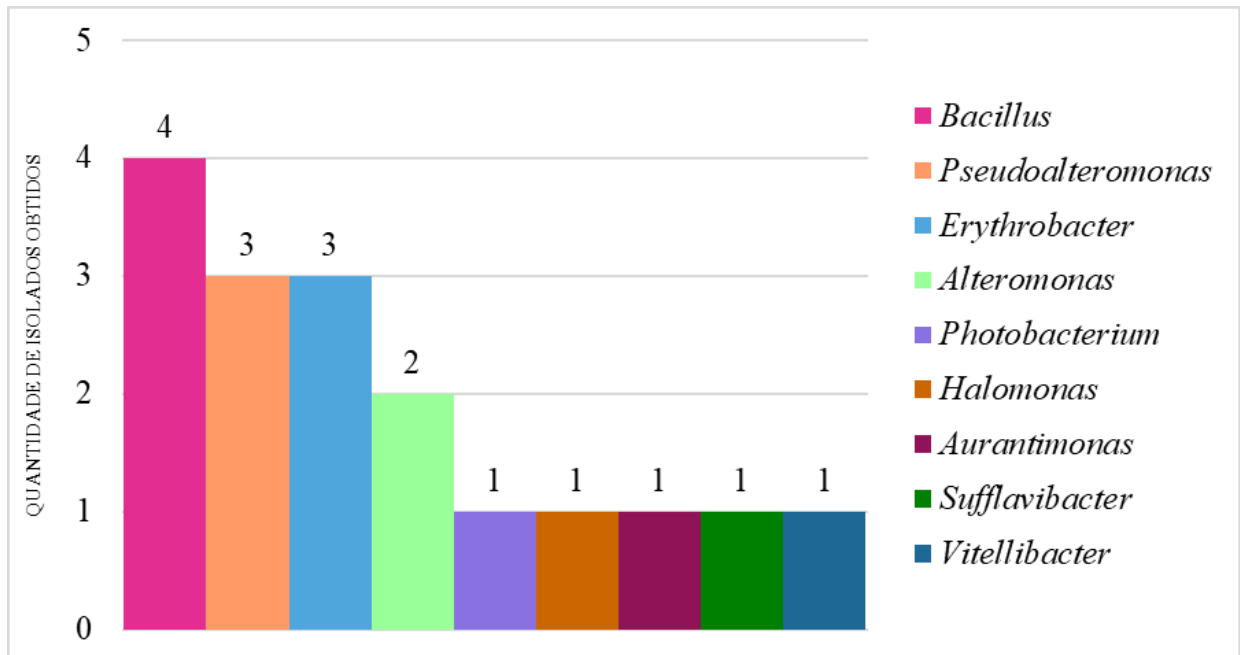


Figura 15 Relação de gêneros encontrados em amostras de água de oceano profundo.

A partir das amostras de sedimento de oceano profundo foi possível obter 4 isolados microbianos, com a predominância do gênero *Bacillus* (2), seguido de *Staphylococcus* e *Halomonas* que apresentaram um isolado cada (**Figura 16**).

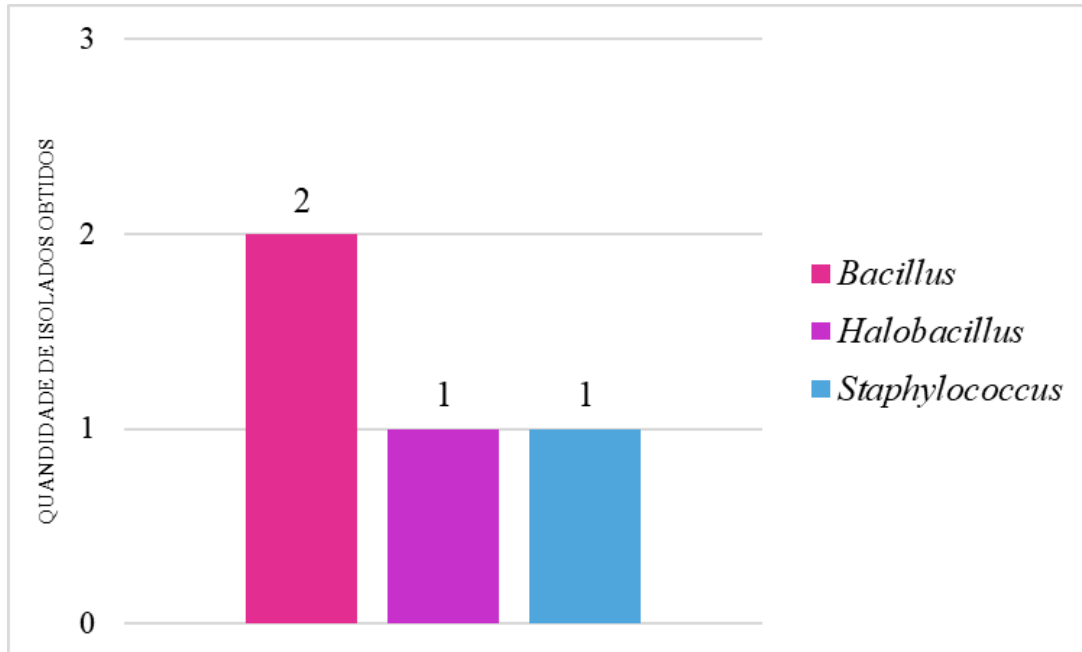


Figura 16 Relação de gêneros encontrados em amostras de sedimento de oceano profundo.

A partir das amostras de esponjas, foram obtidos um total de 26 gêneros microbianos. Para os corais, obteve-se 12 gêneros e da, água de oceano profundo, 9 gêneros. A partir do sedimento foi possível obter 4 isolados bacterianos, pertencentes a 3 gêneros distintos, *Bacillus* (2), *Halobacillus* (1) e *Staphylococcus* (1) (**Figura 16**). Alguns gêneros bacterianos pôde ser encontrado em todas as amostras, com exceção do sedimento, como *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Halomonas* e *Bacillus*. Contrariamente, alguns gêneros foram encontrados somente em algumas amostras, como no caso do *Moritella* sp., encontrado somente nas amostras de esponja (22 isolados), *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Rhodobacteriacea bacterium* e *Marinobacter*. Alguns gêneros da classe Bacilli (*Oceanobacillus*, *Fictibacillus* e *Staphylococcus*), *Shimia* sp., *Curtobacterium* sp. e *Tenacibaculum* sp. entre outros gêneros foram observados somente em amostras de corais. Da mesma forma, os gêneros *Erytrobacter*, *Aurantimonas*, *Sufflavibacter* e *Vitellibacter* foram obtidos apenas de amostras de água de oceano profundo. Embora essa descrição tenha sido feita para uma melhor compreensão dos resultados, não pode-se afirmar que esses grupos microbianos sejam exclusivamente encontrados em cada amostra de forma específica. Isso porque este foi um estudo descritivo de diversidade microbiana, visto a imprecisão das amostras que seriam encontradas nas profundidades e diferentes pontos de

coleta da expedição oceanográfica realizada. Os cultivos microbianos foram sendo realizados

a medida em que os animais eram coletados, com o objetivo de se obter a maior diversidade de micro-organismos possível, mas sem a utilização de réplicas ou dados estatísticos.

Gênero	Esponjas	Coral	Água
<i>Pseudoalteromonas</i>	24	36	3
<i>Acinetobacter</i>	15	28	
<i>Vibrio</i>	9	19	
<i>Photobacterium</i>	22	3	1
<i>Moritella</i>	18		
<i>Alteromonas</i>	2	8	2
<i>Halomonas</i>	6	6	1
<i>Shewanella</i>	9		
<i>Pseudomonas</i>	7		
<i>Bacillus</i>	2	11	4
<i>Oceanobacillus</i>		2	
<i>Fictibacillus</i>		2	
<i>Staphylococcus</i>		1	
<i>Rhodobacteraceae</i>			
<i>bacterium</i>	5		
<i>Marinobacter</i>	4		
<i>Erythrobacter</i>			3
<i>Sphingopyxis</i>	2		
<i>Novosphingobium</i>	1		
<i>Marteella</i>	1		
<i>Palleronia</i>	1		
<i>Shimia</i>		1	
<i>Pontivivens</i>	1		
<i>Aliivibrio</i>	1		
<i>Ruegeria</i>	1		
<i>Oceanospirillaceae</i>			
<i>bacterium</i>	1		
<i>Providencia</i>		1	
<i>Cobetia</i>	1		
<i>Aurantimonas</i>			1
<i>Micrococcus</i>	1	1	
<i>Rhodococcus</i>	1		
<i>Williamsia</i>	1		
<i>Curtobacterium</i>		1	
<i>Sufflavibacter</i>			1
<i>Vitellibacter</i>			1
<i>Tenacibaculum</i>		1	
<i>Jeotgalibacillus</i>	1		

Número de isolados
30 a 40
21 a 30
11 a 20
6 a 10
1 a 5
0

Figura 17 Relação entre os isolados obtidos das amostras de coral, esponjas, água de oceano profundo.

O sequenciamento dos isolados mostrou que cerca de 32 isolados obtidos apresentaram baixa similaridade (95%) com as sequências presentes no banco de dados RDP, sendo 2 destes isolados de água de oceano profundo, 27 destes de esponjas e 3 isolados de coral. Dentre as amostras, encontram-se algumas anaeróbias e isolados bacterianos de meios seletivos para metilotróficas, o que pode ser um fator interessante na busca por novas espécies e até mesmo novos gêneros bacterianos com características fenotípicas e genotípicas interessantes desse ambiente (Tabela 2).

Tabela 2 Isolados com baixa similaridade (<95%) comparadas às sequências do banco de dados RDP.

Isolado	Similaridade	Identidade
AN2	<i>Photobacterium sp. SS12.10; KC160903</i>	904
M7	<i>Acinetobacter haemolyticus; NRRL B-59991; KF185109</i>	918
AN13	<i>Jeotgalibacillus marinus; ATCC29841; AB021190</i>	904
C15	<i>Acinetobacter sp. 86E; KM021012</i>	934
AN15	<i>Photobacterium sp. P65; EU864266</i>	859
AN16	<i>Photobacterium indicum; SE4; AY771742</i>	942
C17	<i>Acinetobacter sp. NFM2; GQ377756</i>	945
AN21	<i>Pontivivens insulae (T); GYSW-23; KP662553</i>	796
AN28	<i>Vibrio sp. S4074; FJ457586</i>	933
AN36	<i>Photobacterium phosphoreum; AK5; AY345890</i>	798
AN38	<i>Oceanospirillaceae bacterium 2CH8; HG004168</i>	909
AN39	<i>Aliivibrio wodanis; AF329728</i>	806
AN43	<i>Vibrio sp. 2197; HF549237</i>	937
P76	<i>Rhodococcus sp. EM6; FJ517626</i>	898
A192	<i>Bacillus acidicola (T); 105-2; AF547209</i>	842
C207	<i>Acinetobacter junii; GIST-BD1; EF429000</i>	759
P283	<i>Shewanella sp. BPRC9; KC465249</i>	944
P285	<i>Shewanella sp. E505-14; FJ169987</i>	904
P298	<i>Acinetobacter sp. MB22; FR677019</i>	933
P311	<i>Moritella sp. J28; AB011356</i>	929
P347	<i>Acinetobacter sp. H1(2013); KC505179</i>	929
P357	<i>Shewanella piezotolerans (T); WP3; AJ551090</i>	947
P358	<i>Photobacterium frigidophilum (T); SL13; AY538749</i>	943
P360	<i>Shewanella sediminis HAW-EB3; CP000821</i>	917
P370	<i>Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054</i>	937
P386	<i>Photobacterium sp. SS12.10; KC160903</i>	943
P398	<i>Photobacterium indicum (T); MBIC3157; AB016982</i>	924
P400	<i>Photobacterium indicum (T); MBIC3157; AB016982</i>	931
P401	<i>Photobacterium sp. SS12.11; KC160904</i>	877
P402	<i>Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054</i>	944
P408	<i>Halomonas sp. YD-6; EU309475</i>	946
A422	<i>Photobacterium lipolyticum (T); M37; AY554009</i>	932

Para uma investigação mais profunda sobre esses isolados, as mesmas sequências foram comparadas usando o banco de dados BLASTn. A partir dessa comparação, observou-se que dos 32 isolados, apenas 17 apresentaram baixa similaridade (próximo de 97%) com esse banco de dados (Tabela 3).

Tabela 3: Isolados com baixa similaridade (próximo de 97%) com o BLASTn e comparação da porcentagem de identidade encontrada com o banco de dados RDP e BLASTn.

ID	Best match BLASTn	BLAST n %	Best match RDP	RD P %
AN2	Uncultured gamma proteobacterium clone PICO pp37 Rainbow 145	93.27	Photobacterium sp. SS12.10; KC160903	904
AN2	Photobacterium sp. strain DZ-04-06-aga	93.19		
AN1 3	Jeotgalibacillus marinus strain QS57	96.71	Jeotgalibacillus marinus; ATCC29841; AB021190	904
AN2 4	Sulfitobacter sediminilitoris JBTF-M-27	97.59		
AN2 4	Rhodobacteraceae bacterium E13	99.16	Rhodobacteraceae bacterium E13; KJ786459	968
AN3 3	Sulfitobacter sediminilitoris JBTF-M-27	97.16		
AN3 3	Rhodobacteraceae bacterium E13	98.78	Rhodobacteraceae bacterium E13; KJ786459	953
AN3 8	Sinobacterium caligoides strain 215GM14-1	96.87		
AN3 8	Oceanospirillaceae bacterium 1CH5	96.87	Oceanospirillaceae bacterium 2CH8; HG004168	909
AN4 3	Vibrio splendidus strain CECT 8433	96.88	Vibrio sp. 2197; HF549237	937
C81	Bacillus sp. JCM 28687	97.43	Fictibacillus arsenicus; B3; GQ304784	962
P135	Shewanella algae strain Hainan	96.81	Shewanella algae; MARS 14; LN795823	959
A180	Alteromonas portus strain HB161718	95.99	Alteromonas alvinellae; HY757; AF288360	971
C213	Acinetobacter sp. 6-12	97.03	Acinetobacter sp. 6-12(2010); HM489955	965
P273	Vibrio sp. VibC-Oc-045	97.08	Vibrio sp. VibC-Oc-045; KF577054	958
P311	Moritella sp. 28	96.81	Moritella sp. J28; AB011356	929
P347	Acinetobacter sp. N3	96.96	Acinetobacter sp. H1(2013); KC505179	929
P386	Photobacterium sp. SS12	95.43	Photobacterium sp. SS12.10; KC160903	943
P398	Photobacterium sp. E703-12	97.04	Photobacterium indicum (T); MBIC3157; AB016982	924
P402	Photobacterium sp. H1-70	96.80	Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	944
P404	Halomonas sp. SN5092	97.66	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	965

Esses resultados sugerem que a utilização de mais de um banco de dados referência para a comparação e identificação microbiana, pode ser importante para uma taxonomia mais precisa e futuras investigações acerca da descoberta de novos grupos ou espécies

microbianas.

6.2 ÁRVORES FILOGENÉTICAS

A construção das árvores filogenéticas possibilitou a observação da relação evolutiva entre os isolados e as sequências de referências presentes do banco de dados utilizado, o RDP. A classe gammaproteobacteria foi a predominante entre os isolados, e nas árvores de corais e esponjas cujos isolados eram aeróbios este grupo foi comprimido para uma melhor avaliação das demais relações filogenéticas. Pode-se observar que a relação filogenética entre os isolados de coral demonstrou que alguns deles são mais similares entre si do que com as sequências presentes no banco de dados RDP, além de possuírem um baixo valor de confiança de relacionamento (**Figura 18**). O mesmo também foi visto em amostras de esponjas (**Figura 19**), e em isolados anaeróbios (**Figura 20**) e também em amostras de água de oceano profundo (**Figura 21**). Embora tenha se observado essa característica, alguns grupos foram bem definidos e próximos as sequências depositadas no banco de dados, o que permite sua correta identificação e filiação genética.

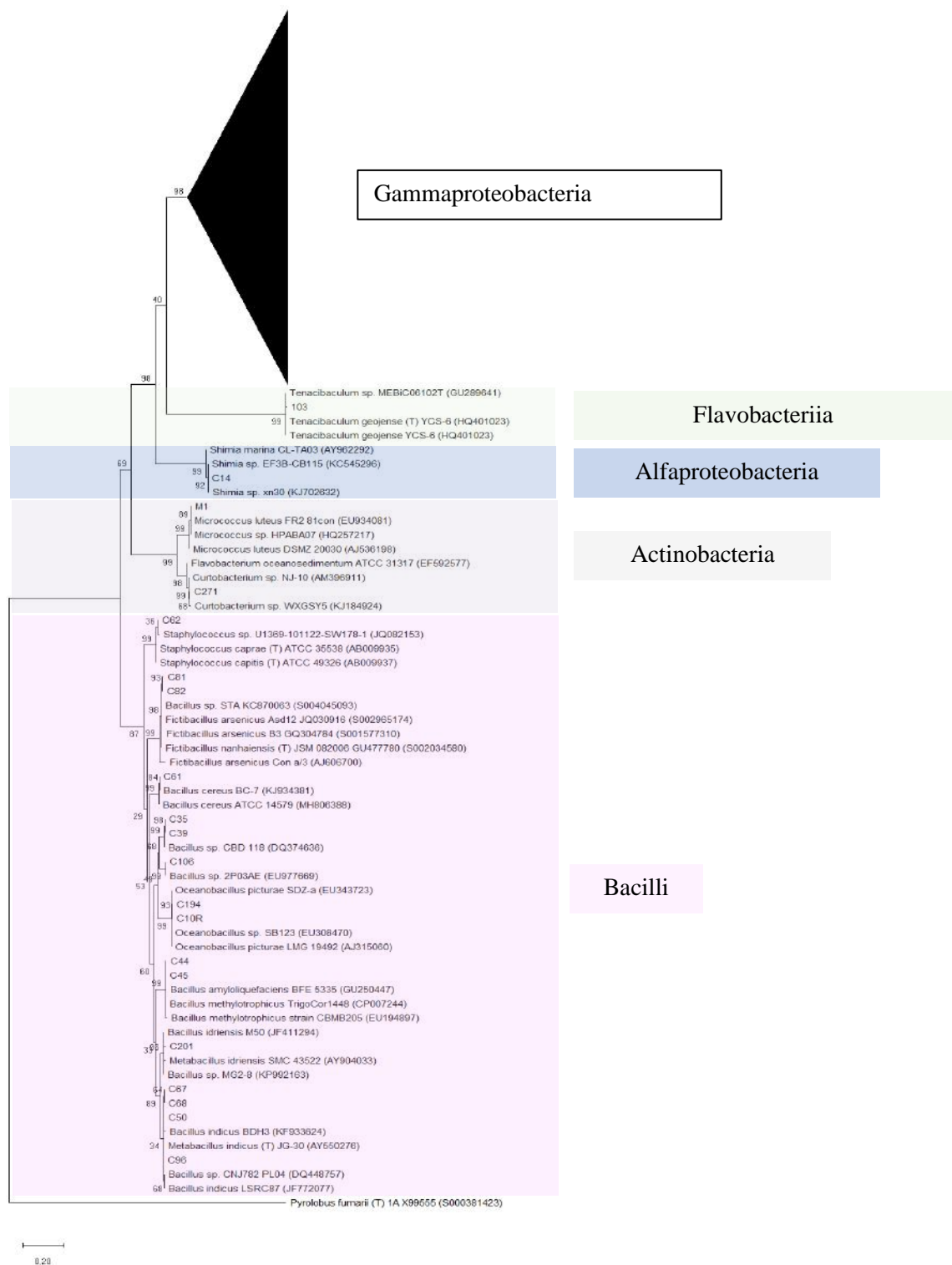


Figura 18 Árvore filogenética dos isolados de corais de oceano profundo construída pelo método Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e modelo *General Time Reversible* a partir do software MEGA X. Bootstrap=100. As classes microbianas foram destacadas (Gammaproteobacteria, Flavobacteriia, Alphaproteobacteria, Actinobacteria e Bacilli).

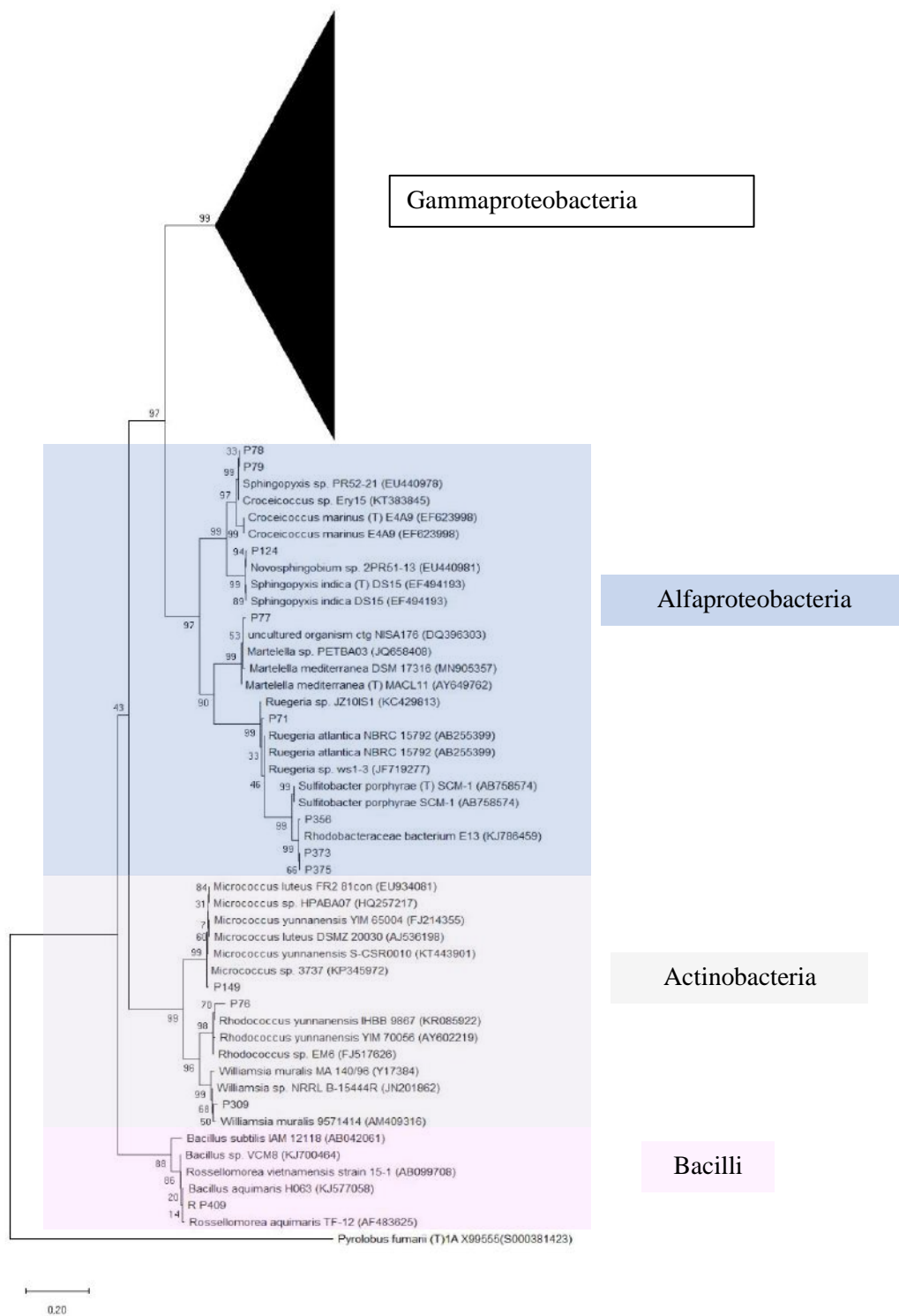


Figura 19 Árvore filogenética dos isolados aeróbicos das esponjas de oceano profundo construída pelo método Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e modelo Tamura-Nei a partir do software MEGA X. Bootstrap=100. As classes microbianas foram destacadas (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria e Bacilli).



Figura 20 Árvore filogenética dos isolados anaeróbicos das esponjas de oceano profundo construída pelo método Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e modelo Tamura-Nei a partir do software MEGA X. Bootstrap=100.

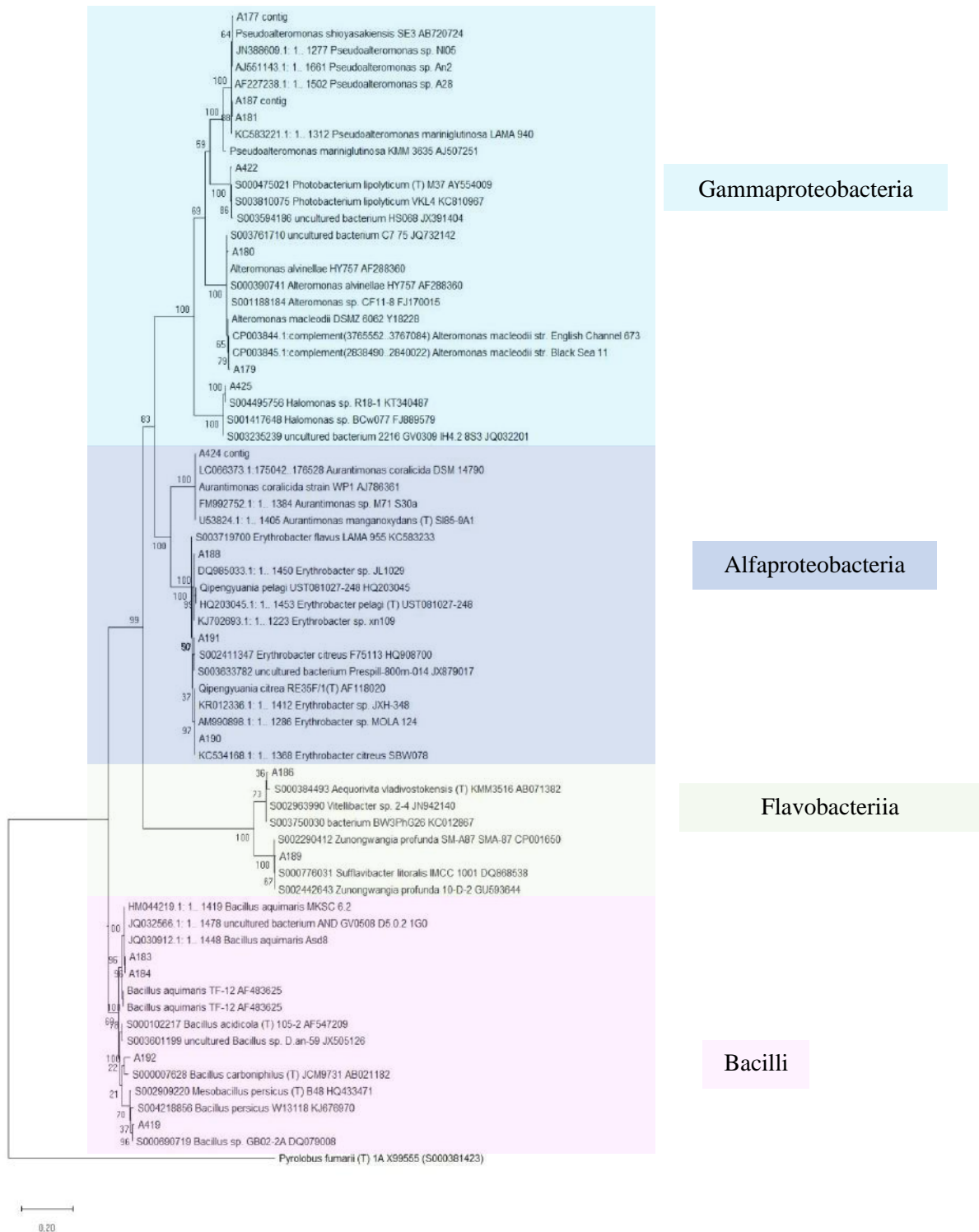


Figura 21 Árvore filogenética dos isolados da água de oceano profundo construída pelo método Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e modelo Tamura-Nei a partir do software MEGA X. Bootstrap=100.

7 DISCUSSÃO

O ambiente de oceano profundo, embora muito vasto, ainda é pouco conhecido no âmbito das pesquisas e estudos científicos (Jannasch e Taylor, 1984; Rogers, 2015). Devido a isso, há um grande interesse por parte de pesquisadores ao redor do mundo nos estudos acerca desse bioma, que possui uma grande diversidade biológica ainda inexplorada, sendo atrativo para novas descobertas microbiológicas e potenciais biotecnológicos (Costello e Chaudhary, 2017; Thompson *et al.*, 2018). O oceano profundo possui características que o tornam um ambiente único, apresentando altas pressões hidrostáticas (Jebbar *et al.*, 2015), variações de temperatura (Yayanos, Dietz e Boxtel, 1981; Chevaldonné, Desbruyères e Le Haître, 1991), pouca ou nenhuma incidência de luz (Warrant e Locket, 2004) e pouca disponibilidade de nutrientes, sendo considerado um ambiente oligotrófico por alguns pesquisadores (Warrant e Locket, 2004). Ainda assim, mesmo com características consideradas extremas para a vida (Oarga, 2009), o oceano profundo abriga uma vasta diversidade de vida marinha, com destaque para os recifes de coral, que servem como refúgio para diversas espécies de peixes e outros organismos (Costello e Chaudhary, 2017; Kitahara *et al.*, 2020). Ainda, os principais animais dos recifes de coral – os corais e as esponjas - são hospedeiros para simbioses microbianas que são de suma importância para sua sobrevivência, uma vez que auxiliam seus hospedeiros na captação de nutrientes (Röthig *et al.*, 2017), na defesa contra patógenos (Kelly *et al.*, 2014; Bourne, Morrow e Webster, 2016; Galand *et al.*, 2018), na produção de metabólitos importantes para seu metabolismo (Modolon *et al.*, 2020), além de estarem envolvidos na ciclagem biogeoquímica (Arrigo, 2005), exercendo papel primordial para a manutenção da vida nos recifes de coral das regiões mais profundas do oceano.

O estudo de micro-organismos da coluna d'água e de amostras de sedimento de oceano profundos são mais frequentes quando comparados a estudos de diversidade microbiana simbiótica em corais e esponjas, isso se dá principalmente às dificuldades de coleta e cultivo das amostras advindas desses animais (Dick *et al.*, 2013).

Diante disso, este estudo teve como objetivo fazer um levantamento e identificar os micro-organismos presentes em amostras de coral, esponjas, água e sedimento de oceano profundo coletados na Bacia de Campos, Rio de Janeiro, durante a expedição oceanográfica PROBIO-DEEP.

A partir da incubação das amostras em diferentes meios de cultura foi possível obter um total de 286 isolados bacterianos, demonstrando que a utilização de diferentes fontes nutricionais e de formas de incubação são eficazes na obtenção de uma grande diversidade de micro-organismos. O estudo de Gärtner e colaboradores (2011) utilizou métodos dependentes de cultivo em 5 meios para o isolamento microbiano a partir do sedimento da bacia de Ierapetra, no Oeste Mediterrâneo, a 4400 m de profundidade, além de terem utilizado de ferramentas de biologia molecular, como a amplificação do gene 16S rRNA para a identificação microbiana. Com essa metodologia, foi possível identificar 107 isolados presentes em 49 grupos taxonômicos, sendo a maioria presente no filo Firmicutes (52%) e Actinobacteria (32%), tendo somente um único representante nos filios Alpha- e Gammaproteobacteria (Gärtner *et al.*, 2011). Além de micro-organismos pertencentes ao filo Firmicutes, o filo Proteobacteria também foi encontrado em sedimentos profundos (Zhang *et al.*, 2015). A partir de metodologias independentes de cultivo, pela amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA, conseguiram obter cerca de 138 gêneros distintos, presentes em 31 filios bacterianos, dos quais 35.7% fazem parte de Proteobacteria; 6.6% dos gêneros encontrados são constituintes do filo Firmicutes, e 3.3% de Actinobacteria, dentre outros filios encontrados (Zhang *et al.*, 2015). De forma similar, este trabalho com o uso do cultivo tradicional, isolou e identificou 4 bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, 2 *Bacillus*, 1 *Halobacillus* e 1 pertencente ao gênero *Staphylococcus*, obtidos dos meios generalistas Marine ágar e R2A. O baixo número de isolados a partir do sedimento pode ser explicado devido à dificuldade de cultivo das amostras de oceano profundo, sendo necessário buscar alternativas para melhorar a recuperação desses micro-organismos, seja por meio de suplementação dos meios de cultura, ou por diferentes abordagens de cultivo, como utilização de outras variações de temperatura ou na presença/ausência de oxigênio. Esses estudos ressaltam a importância do uso de estratégias polifásicas para a investigação taxonômica dos ecossistemas, visto que o emprego de diferentes metodologias podem selecionar diferentes grupos microbianos (Das *et al.*, 2014).

Ainda, há na literatura trabalhos que reportaram a grande diversidade de simbiontes microbianos encontrada em corais de oceano profundo com potencial biotecnológico (Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2017). O isolamento microbiano possibilitou a identificação de 78 micro-organismos pertencentes ao filo Actinobacteria, e dentre eles, alguns possuíam atividade antimicrobiana. Neste trabalho, foi possível isolar somente 5 estirpes do filo Actinobacteria, pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Curtobacterium* e

Williamsia. Micrococcus sp. isolado de coral do mar raso *Mussismilia braziliensis* foi reportado na literatura como produtor de gelatinases, queratinases e lipases, enzimas que podem ter aplicações industriais (Vilela *et al.*, 2021). Mais especificamente, o trabalho de Galkiewicz e colaboradores (2010) investigou a comunidade microbiana presente no coral rochoso *Lophelia pertusa* (*Desmophyllum pertusum*), de um recife de coral no Golfo do México, coletados a uma profundidade de 500 m. Por meio do isolamento microbiológico complementado com a identificação filogenética utilizando-se o gene 16S rRNA, foram obtidos isolados bacterianos pertencentes as classes Gammaproteobacteria, em maior abundância os gêneros *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium* e *Vibrio*, além das classes Betaproteobacteria e Actinobacteria (Galkiewicz *et al.*, 2010). De forma similar aos grupos microbianos encontrados neste trabalho, a classe Gammaproteobacteria foi predominante e também foram encontrados os mesmos gêneros em abundância nas amostras de coral de oceano profundo.

Especificamente, neste trabalho foi possível a identificação microbiana por meio da implementação de metodologias dependentes cultivo, com a predominância do filo Proteobacteria, sendo os gêneros *Pseudoalteromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Vibrio* sp. e *Photobacterium* sp. os mais abundantes examinando todas as amostras de oceano profundo coletadas. Considerando o coral *Desmophyllum pertusum* como fonte de isolamento microbiano, foi possível a obtenção de 18 isolados bacterianos, pertencentes aos gêneros *Pseudoalteromonas* (10 isolados), *Bacillus* (3), *Acinetobacter* (2), *Halomonas* (2) e *Alteromonas* (1). Dentre eles, 11 isolados pertencentes aos gêneros *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* e *Bacillus* foram obtidos de diferentes meios contendo óleo, seletivo para bactérias potencialmente degradadoras de óleo, onde esse composto foi utilizado na sua forma solúvel e insolúvel. O gênero *Pseudoalteromonas* foi predominante nesta seleção, e já foi descrito na literatura como capaz de degradar óleo em ambientes marinhos (Bayat, Hassanshahian e Hesni, 2015). Além da habilidade em crescer contendo o óleo solúvel como única fonte de carbono, este gênero foi capaz também de crescer em meio seletivo BH com adição de óleo insolúvel, demonstrando sua potencial capacidade em degradar ambos os tipos de óleos – solúvel e insolúvel - testados. Além disso, o gênero *Pseudoalteromonas* apresentou potencial benéfico (BMC- *Beneficial Microorganisms for Corals*) para o coral de mar raso *Pocillopora damicornis* frente à estresse térmico e infecção pelo patógeno de corais *Vibrio coralliilyticus* (Rosado *et al.*, 2019).

Em amostras de esponjas, foram obtidos um total de 138 isolados bacterianos, incluindo as incubações aeróbias e anaeróbias. O filo Proteobacteria foi predominante (132

isolados), seguido de Actinobacteria e Firmicutes, contendo 3 isolados em ambos os filos. O gênero predominante foi *Pseudoalteromonas* sp. (17%), seguido de *Photobacterium* sp. (15%) e *Moritella* sp. (13%).

O gênero *Pseudoalteromonas* sp. pode ser comumente encontrado em amostras advindas do oceano (Galkiewicz *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2019). Esse gênero foi proposto por Gauthner e colaboradores (1995) como sendo um gênero à parte de *Alteromonas*, sendo amplamente estudado por microbiologistas. Este gênero possui funções importantes, como a produção de antimicrobianos que podem estar envolvidos com a pigmentação de algumas estirpes desse gênero (Egan *et al.*, 2002; Bowman, 2007) e a produção de metabólitos e enzimas interessantes para a biotecnologia, que já foram observadas em estirpes que não produzem cor (Bowman, 2007; Mo, Kim e Cho, 2009). Esse grupo bacteriano foi o mais abundante encontrado neste trabalho, tanto em amostras de corais quanto de esponjas, sugerindo que sua simbiose com os hospedeiros pode ser benéfica para esses animais, auxiliando na proteção contra possíveis patógenos e na produção de metabólitos e enzimas importantes. Ainda, as distintas características que os isolados de oceano profundo podem apresentar, indica que o aprofundamento do estudo de micro-organismos oriundos desse ecossistema podem representar importantes fontes de produtos para a aplicações no ramo da biotecnologia.

Adicionalmente, para as amostras de esponjas foi realizada uma incubação em anaerobiose em meios de cultura seletivos (MMMF e MMMA) e para bactérias generalistas de esponjas (MB20), obtendo um total de 37 isolados pertencentes aos gêneros *Photobacterium* (24.3%), *Pseudoalteromonas* (18.9%) e *Vibrio* (15.3%). Nesses resultados, destaca-se o predominante gênero *Photobacterium*, um gênero bacteriano pertencente ao filo Proteobacteria, onde as bactérias desse grupo são conhecidas devido à sua capacidade de bioluminescência (Labella *et al.*, 2017). Esse grupo é amplamente encontrado em amostras advindas do oceano, sendo visto em amostras de sedimento, amostras da coluna d'água e também de organismos que habitam esse ambiente, como no caso de esponjas e corais (Labella *et al.*, 2017). Esses micro-organismos podem estar intimamente relacionados com a produção de metabólitos importantes para a vida de seu hospedeiro (Skropeta, 2008), como a produção de compostos antimicrobianos, enzimas esterases e asperaginases, além de ser um importante indicador microbiano para mudanças no ambiente e indicador de estresses nos hospedeiros (Moi *et al.*, 2017). Os principais gêneros obtidos em anaerobiose já foram cultivados previamente em estudos de amostras de águas marinhas, indicando sua habilidade de biodegradar complexos químicos quando em anaerobiose, podendo até utilizarem

compostos nitrogenados e sulfurosos como produtos de sua respiração (Proctor e Gunsalus, 2001; Cheg *et al.*, 2019; Zan *et al.*, 2022).

O estudo de micro-organismos de oceano profundo, além de ser importante para uma melhor compreensão da comunidade microbiana que existe nesse ecossistema, é relevante no entendimento dos ciclos biogeoquímicos ali presentes. Nesse ambiente, por não haver produção primária pela fotossíntese (devido à falta de incidência de raios solares), os micro-organismos pelágicos são os responsáveis por realizar essa produção, por um processo chamado quimiossíntese bacteriana, que igualmente a fotossíntese envolve o consumo de CO₂, mas na ausência de luz. Micro-organismos quimiautotróficos de oceano profundo realizam esse processo por meio da assimilação de CO₂, ou por meio da oxidação de compostos inorgânicos para obterem energia, além disso eles podem utilizar de outros compostos, como nitrato, sulfeto, sulfato, tiosulfato, Fe (III) e uma gama de elétrons que estão disponíveis nesse ambiente, em seu metabolismo (Takai e Nakamura, 2011; Jebbar *et al.*, 2015). Com isso, destaca-se a importância em se utilizar diferentes meios de cultura seletivos para esses metabolismos quimiossintéticos, como forma de melhor compreendê-los, além da utilização de equipamentos que tornem seu cultivo similar ao habitat natural desses animais, como por exemplo, jarras de anaerobiose para micro-organismos anaeróbios, equipamentos que mantenham a pressão hidrostática similar ao que é encontrado em oceano profundo (Garel *et al.*, 2019), estufas para aplicação de variação de temperatura, e meios de cultura que sejam suplementados com os nutrientes necessários ao crescimento de micro-organismos específicos.

Pode-se observar que o emprego de diferentes meios de cultura neste projeto foi capaz de identificar uma diversa comunidade microbiana presente no ecossistema de oceano profundo, sendo cada vez mais necessário a implementação de ferramentas que permitam não só tornar conhecido os micro-organismos associados à corais e esponjas de recifes de oceano profundo, mas também investigar especificamente as capacidades de biodegradação, produção de metabólitos secundários e possíveis aplicações biotecnológicas que esses micro-organismos podem desempenhar (Modolon *et al.*, 2020). Com isso, a utilização de ferramentas de cultivo aprimoradas, diferentes temperaturas, meios suplementados com vitaminas e outros compostos, o emprego de câmaras anóxicas e incubações na presença de oxigênio devem ser cogitadas, de forma a agregar uma maior obtenção e conhecimento acerca desses micro-organismos (Kato, Nogi e Arakawa, 2008; Aoki *et al.*, 2014; Zhang,

Wu e Zhang, 2018).

Além da identificação clássica, baseada em isolamento e extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA, podem ser utilizadas outras ferramentas para ampliar o conhecimento dos micro-organismos de oceano profundo, como por exemplo a técnica de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), que consiste na utilização de sondas de fluorescência específicas para DNA e RNA que se hibridizam nas moléculas de DNA, e por meio da excitação de uma onda luz do microscópio de fluorescência, emite a cor e pode então auxiliar na identificação de um micro-organismo não cultivável (Cerqueira *et al.*, 2008).

Além disso, o emprego de ferramentas de bioinformática é de suma importância, uma vez que a utilização conjunta de metodologias de isolamento e identificação filogenética (estratégias polifásicas) são importantes para o conhecimento dos micro-organismos, seus potenciais biotecnológicos e conseqüentemente, de agregação de valor ao ecossistema de oceano profundo. As ferramentas de bioinformática podem ser aplicadas não somente como forma de identificar os micro-organismos, mas também na busca de novos metabólitos, que são importantes para a viabilidade tanto do micro-organismo quanto do hospedeiro nesse local (Tang *et al.*, 2017; Moreno-Ulloa *et al.*, 2020; Sieg *et al.*, 2022).

8 CONCLUSÃO

Os recifes de coral de oceano profundo albergam uma grande diversidade microbiana, presente na coluna d'água, no sedimento, assim como em associação com corais e esponjas. Neste trabalho, foi possível isolar um total de 286 estirpes bacterianas, pertencentes ao filo Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, em ordem de abundância. Esses micro-organismos foram classificados em 37 gêneros, sendo *Pseudoalteromonas* o mais abundante, seguido de *Acinetobacter* e *Vibrio* no cultivo aeróbio. Em anaerobiose, foi possível obter 37 isolados, distribuídos em 14 gêneros distintos, sendo o *Photobacterium* sp. o mais abundante, representando 24% da comunidade total dos anaeróbios.

O uso de estratégias polifásicas com o uso da microbiologia tradicional de cultivo microbiano e ferramentas de bioinformáticas para a identificação microbiana possibilitou a recuperação de uma grande diversidade de micro-organismos associadas às amostras de oceano profundo, com a potencial descoberta de 17 novas espécies ou até mesmo gêneros

microbianos, devido à baixa similaridade com as sequências referências do banco de dados. Além disso, esses micro-organismos podem representar uma fonte inestimada de produtos naturais com futuras aplicações biotecnológicas, que devem ser exploradas de maneira sustentável para agregação de valor ao ecossistema de oceano profundo, e conseqüentemente para a sua conservação.

9 ANEXOS

9.1 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE ESPONJAS

ID	Morfologia	Fonte	Prof. (~)	Temp. (°C)	Aerobic/ anaerobic	Meio	Best match	%
P69	Bege, irregular, fosca, rugosinha	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Marinobacter adhaerens (T); HP15; AY241552	982
P70	Bege, borda irregular, fosca	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Alteromonas sp. S123; AB712356	980
P71	Transparente, circular, brilhante,	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Ruegeria sp. ws1-3; JF719277	960
P72	Bege, circular, pequena, brilhante	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Marinobacter alkaliphilus; 2PR56-13; EU440994	981
P73	Bege, rugosa, circular, fosca	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	996
P74	Bege, leitosa, pequena, lisa, brilhante	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Alteromonas australica; H17; CP008849	983
P75	Bege, fosca, irregular	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	MMMF	Vibrio sp. D1234; DQ480141	992
P76	Laranja, lisa, pequena, brilhante	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Rhodococcus sp. EM6; FJ517626	898
P77	Branca, lisa, brilhante, pequena	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Marteleva sp. PETBA03; JQ658408	971
P78	Verde, transparente, brilhante, lisa	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Sphingopyxis sp. PR52-21; EU440978	993
P79	Verde, transparente, brilhante, lisa	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Sphingopyxis sp. PR52-21; EU440978	995
P115	Bege, lisa, brilhante	Calyx sp.	670	26°C	Aerobic	MMM + volátil	'pseudoalteromonas sp. INTCD224H; AB274752	971
P118	Bege, fosca, rugosa, irregular	Calyx sp.	670	26°C	Aerobic	MMM + volátil	Vibrio gigantis; S-31; JF412227	967

P121	Bege, fosca, rugosa, irregular	Calyx sp.	670	26°C	Aerobic	MMM + volátil	Vibrio sp. S2228; FJ457428	996
P122	Bege, leitosa, pequena, brilhante	Calyx sp.	670	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Acinetobacter venetianus; ZX-PKU-001; DQ912805	987
P124	Bege, transparente, brilhante	Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Novosphingobium sp. 2PR51-13; EU440981	991
P125	Bege, escuro, rugoso, fosco	Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	Coral Juice	Pseudoalteromonas sp. OC-5; AY669166	972
P126	Bege claro, rugosa, fosca, circular	Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	Coral Juice	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	987
P128	Branca, borda irregular, brilhante	Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	SOB	Pseudomonas mosselii SJ10; CP009365	986
P131	Branca, lisa, brilhante	Farrea sp.	830	26°C	Aerobic	MMMF	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	968
P133	Bege, rugosa, brilhante, irregular	Farrea sp.	830	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Pseudomonas sp. CA15; HM047297	993
P135	Bege, brilhante, lisa, borda irregular	Farrea sp.	830	26°C	Aerobic	SOB + Glicose	Shewanella algae; MARS 14; LN795823	959
P145	Bege, rugosa, fosca	Aphrocallistes beatrix	830	26°C	Aerobic	MMM + Óleo	Halomonas sp. WP5m-10; JX533686	951
P149	Amarelo, pequena, fosca,	Aphrocallistes beatrix	±672	26°C	Aerobic	MMMA	Micrococcus sp. 3737; KP345972	963
P151	Bege, fosca, circular, lisa	Aphrocallistes beatrix	±672	26°C	Aerobic	MMMA	Pseudoalteromonas sp. BJ19; FJ876421 (S001417479)	992
P116 2		Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	MMM + volátil	Pseudoalteromonas arabiensis; M1C_0m_02; KM041177	989
P273	Branca, fosca	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMM + Óleo	Vibrio sp. VibC-Oc-045; KF577054	958

P274	Bege, lisa, fosca, irregular	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMMA	Cobetia marina; KMM 296; AY628693	985
P276	Bege, lisa, fosca	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMMA	Moritella sp. JAM-GA22; AB526345	978
P278	Bege, fosca, irregular	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMMF	Moritella sp. HAR65; AB011359	982
P279	Bege escuro, fosco, circular	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMMF	Moritella sp. J28; AB011356	956
P281	Bege escuro, liso, brilhante, pequena	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMMA	Moritella sp. J13; AB011355	960
P283	Marrom, lisa, brilhante, circular	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MB20	Shewanella sp. BPRC9; KC465249	944
P285	Rosa, lisa, brilhante	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MB20	Shewanella sp. E505-14; FJ169987	904
P286	Bege, borda transparente, lisa, brilhante	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium sp. KB2-7; FN377728	952
P287	Branco, fosco, circular, lisa	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	SOB	Pseudomonas mosselii; L27; JX646650	964
P288	Bege clara, rugosa, fosca	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	MMM + volátil	Moritella sp. JAM-GA22; AB526345	969
P292	Branca, brilhante, lisa	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	976
P293	Branca, brilhante, lisa, circular	Calyx sp.	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Pseudomonas sp. MBIC2027; O6S2-1; AB030085	987
P295	Branca, fosca, lisa, circular	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	SOB	Acinetobacter johnsonii; CAI-6; DQ257426	981
P296	Branca, fosca, lisa, circular	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	SOB	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	982
P297	Branca, centro esverdeado, brilhante, lisa	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	SOB + Glicose	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	985
P298	Branca, centro esverdeado, brilhante, lisa	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	SOB + Glicose	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	933

P299	Branca, lisa, brilhante	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	SOB + Glicose	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	996
P303	Bege, transparente, lisa, brilhante	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	MMMA	Halomonas sp. 71(27zx); AM409193	997
P308	Bege, lisa, brilhante	Farrea sp.	830	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoaltero monas atlantica; AR06; AB049728	973
P309	Laranja clara, rugosa, borda irregular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	SOB	Williamsia sp. NRRL B- 15444R; JN201862	951
P311	Laranja, brilhante, lisa, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Moritella sp. J28; AB011356	929
P312	Laranja escuro, fosca, lisa	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Moritella sp. J28; AB011356	955
P313	Branca, lisa, leitosa, brilhante	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoaltero monas marina; CM2; KF193949	972
P314	Branca, fosca, irregular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoaltero monas atlantica; AR06; AB049728	979
P315	Bege, liso, brilhante	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoaltero monas sp. BSw20080; EU365545	966
P316	Bege, liso, fosco, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoaltero monas sp. BN05-S-3; JN864001	995
P318	Bege, fosca, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Pseudoaltero monas sp. BSs20039; EU365536	978
P319	Bege clara, fosca, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Photobacteriu m sp. Mj214; GQ454974	968
P321	Bege transparente, lisa, brilhante	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Photobacteriu m profundum; 3TCK; DQ027054	952
P322	Bege, lisa, brilhante	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Pseudoaltero monas sp. BSs20039; EU365536	978

P323	Bege clara, fosca, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Moritella sp. SC20; AB011360	959
P324	Bege escura, fosca, circular	Characella sp.	670	6°C	Aerobic	MMMF	Moritella sp. J28; AB011356	967
P329	Laranja escura, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	987
P330	Rosa clara, fosca, circular, lisa	S.I	830	6°C	Aerobic	MMMA	Pseudoalteromonas sp. WM40a; HG004201	996
P332	Branca, fosca, circular	S.I	830	6°C	Aerobic	MMMA	Halomonas axialensis (T); Althf1; ATCC BAA-802	989
P334	Bege, leitosa, brilhante, circular	S.I	830	6°C	Aerobic	MB20	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	987
P338	Bege, lisa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	MB20	Marinobacter adhaerens (T); HP15; AY241552	975
P339	Bege, lisa, fosca, centro bege escuro	S.I	830	6°C	Aerobic	MMMF	Pseudoalteromonas sp. ARCTIC-P16; AY573035	983
P342	Branca, leitosa, lisa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter johnsonii; CAI-6; DQ257426	975
P343	Branca, pequena, circular, lisa	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Pseudomonas sp. BCNU171; DQ229316	988
P344	Bege, pequena, lisa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromonas sp. BSi20555; EU330352	951
P346	Bege, rugosa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	984
P347	Branca, lisa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter sp. H1(2013); KC505179	929
P348	Branca, lisa, circular, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	956
P350	Branca, lisa, brilhante	S.I	830	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter johnsonii;	986

P351	Bege clara, fosca	undentified	670	6°C	Aerobic	MMMA	3P09AB; EU977714 Moritella sp. SC25; AB011362	973
P356	Rosa, lisa, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Rhodobactera ceae bacterium E13; KJ786459	969
P357	Verde clara, lisa	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Shewanella piezotolerans (T); type strain: WP3; AJ551090	947
P358	Amarela clara, fosca, circular	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Photobacteriu m frigidiphilum (T); SL13; AY538749	943
P360	Rosa clara, lisa, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Shewanella sediminis HAW-EB3; CP000821	917
P361	Laranja clara, irregular, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Moritella sp. J28; AB011356	950
P362	Bege escura, lisa, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	MB20	Shewanella sp. VS-7; FJ497707	965
P367	Branca, lisa, circular	undentified	670	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Pseudomonas sp. CL0605; DQ857741	978
P369	Branca, leitosa, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	BH + Óleo Insolúvel	Acinetobacter johnsonii; GM5; KR002423	968
P370	Bege, transparente, lisa, brilhante	undentified	670	6°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Photobacteriu m profundum; 3TCK; DQ027054	937
P373	Rosa clara, lisa, brilhante	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MB20	Rhodobactera ceae bacterium E13; KJ786459	981
P375	Rosa clara, lisa, brilhante	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MB20	Rhodobactera ceae bacterium E13; KJ786459	982
P376	Branca, leitosa, lisa, brilhante	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MB20	Pseudoaltero monas sp.	970

P378	Laranja escura, fosca, circular	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MMMA	An2; AJ551143 Moritella sp. J13; AB011355	986
P379	Rosa clara, lisa, fosca, circular	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MMMA	Moritella sp. J13; AB011355	976
P381	Bege clara, fosca, circular	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MMMMF	Moritella sp. J13; AB011355	989
P385	Laranja escuro, circular, fosca	Pachastrella caliculata	±672	6°C	Aerobic	MMM + volátil	Moritella sp. J28; AB011356	970
P386	Transparente, brilhante, irregular	Pachastrella caliculata	672	6°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Photobacterium sp. SS12.10; KC160903	943
P390	Laranja, lisa, brilhante, circular	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MMMA	Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	969
P395	Bege escuro, circular, fosco	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MMMMF	Moritella sp. J28; AB011356	982
P397	Verde clara, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	989
P398	Bege clara, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium indicum (T); MBIC3157; AB016982	924
P399	Laranja clara, leitosa, brilhante	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	957
P400	Laranja clara, fosca, lisa circular	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium indicum (T); MBIC3157; AB016982	931
P401	Verde, brilhante, lisa	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium sp. SS12.11; KC160904	877
P402	Laranja clara, brilhante, lisa	Pocillastra laminaris	±672	6°C	Aerobic	MB20	Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	944

P404	Amarela, rugosa, fosca	Aphrocallistes beatrix	±672	6°C	Aerobic	MB20	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	965
P408	Branca, lisa, brilhante	Aphrocallistes beatrix	672	6°C	Aerobic	MB20	Halomonas sp. YD-6; EU309475	946
P409	Rosa, brilhante, circular, lisa	Aphrocallistes beatrix	±672	6°C	Aerobic	MB20	Bacillus aquimaris; H063; KJ577058	997
M3	Puntiforme, transparente, brilhante	Calyx sp.	830	26°C	Aerobic	Metilotrófico s	Acinetobacter sp. MB22; FR677019	970
M4	Pequena, circular, leitosa, brilhante	S.I	±672	26°C	Aerobic	Metilotrófico s	Acinetobacter johnsonii; 3P09AB; EU977714	980
M6	Circular, branca, leitosa, média, brilhante	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	Metilotrófico s	Acinetobacter haemolyticus; NRRL B-59991; KF185109	955
M7	Transparente, irregular, grande, mucosa	Characella sp.	670	26°C	Aerobic	Metilotrófico s	Acinetobacter haemolyticus; NRRL B-59991; KF185109	918
M9	Média, circular, branca, brilhante	Farrea	830	26°C	Aerobic	Metilotrófico s	Acinetobacter johnsonii; 3P09AB; EU977714	980

9.2 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE CORAIS

ID	Morfologia	Fonte	Prof . (~)	Temp . (°C)	Aerobico/ anaerobico	Meio	Best match	%
C1	Irregular, bege, fosca, rugosa.	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Acinetobacter sp. A30(2011); JN228279	982
C4	Circular, bege transparente, brilhante, lisa.	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Acinetobacter johnsonii; GM5; KR002423	990
C6	Circular, branca, fosca, lisa.	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Alteromonas sp. SCSWC10	977
C8	Bege transparente furtacor, lisa,	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose	Alteromonas sp. SCSWC10	977

	brilhante, irregular.							Acinetobacter sp. 2D67(2011); JN228331	978
C9	bege, lisa, regular	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose			
	bege, irregular, brilhante, rugosa	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose		Acinetobacter sp. A30(2011); JN228279	982
C12								Acinetobacter baumannii; CTF711-D; KJ416382	980
C13	bege, grande, fosca, circular	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%			
	bege, circular, brilhante	S.I	670	26C	Aerobico	MA 50%		Shimia sp. xn30; KJ702632	983
C14									
	bege, irregular, brilhante, lisa	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%		Acinetobacter sp. 86E; KM021012	934
C15	bege, irregulAR, brilhante, rugosa	S.I	670	26°C	Aerobico	MA		Acinetobacter sp. NFM2; GQ377756	945
	bege clara, grande, irregular,								
C18	fosca, rugosa	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%		Acinetobacter sp. 5g; EU916711	985
	bege, grande, irregular,							Acinetobacter johnsonii; GM5; KR002423	991
C19	fosca, rugosa	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%			
	irregular, bege, brilhante	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%		Acinetobacter johnsonii; GM5; KR002423	991
C20								Acinetobacter johnsonii; KBL-4- 25D; KF049130	978
C21	bege, fosca, irrgular	S.I	670	6°C	Aerobico	MA 50%		Pseudoalteromona s mariniglutinosa; LAMA 940; KC583221	990
	bege, brilhante,lisa, circular	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB			
C22								Acinetobacter johnsonii; GM5; KR002423	992
	bege, irregular, lisa, brilhante	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB			
C23								Acinetobacter johnsonii; 3P09AB; EU977714	995
C25	bege, grande, fosca, irregular	S.I	670	26°C	Aerobico	MA 50%			
	bege, irregular, fosco, rugoso	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose		Acinetobacter sp. 2D67(2011); JN228331	986
C26	Transparente , fosco, irregular, plano	D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	R2A		Bacillus sp. CBD 118; DQ374636	978

C39	bege, fosco, circular Branca, fosca, irregular, grande,	D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Bacillus sp. CBD 118; DQ374636	978
C44	lobulada Branca, fosca, irregular, grande,	D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	R2A	Bacillus methylotrophicus TrigoCor1448; CP007244	982
C45	lobulada	D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	R2A BH + Óleo	Bacillus methylotrophicus TrigoCor1448; CP007244	988
C49	Filamentoso, irregular, branco. Bege clara, pequena, lisa,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	Insolúve l	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	991
C50	brilhante, Bege, leitosa, irregular,	S. variabilis	672	26°C	Aerobico	MA 50%	Bacillus sp. SC-H; FJ626869	985
C52	brilhante Bege, papilada, lisa	S. variabilis	830	26°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromona s sp. ME3-02; AJ784122	989
C54	brilhante Bege, lisa, brilhante,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	Coral Juice	Pseudoalteromona s sp. MON011; KF042033	993
C57	circular Bege claro, lisa, brilhante,	S. variabilis	830	26°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	983
C58	circular Bege, irregular,	S. variabilis	830	26°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	983
C60	fosca, rugosa Branca, lisa, leitosa,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	R2A	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	983
C61	brilhante Bege, borda irregular,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	R2A	Bacillus cereus; BC-7; KJ934381	993
C62	brilhante, lisa Branca, borda irregular,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	R2A	Staphylococcus caprae (T); ATCC 35538; AB009935	982
C65	lisa, brilhante Branca, leitosa, lisa,	S. variabilis	830	26°C	Aerobico	SOB + Glicose	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	986
C66	brilhante Transparente , irregular, grande,	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	SOB + Glicose	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	975
C67	parece um ovo	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	R2A	Bacillus indicus; LSRC87; JF772077	990

C68	Transparente, irregular, grande, parece um ovo	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	R2A	Bacillus idriensis; M50; JF411294	990
C81	Laranja, fosca, lisa, circular	S.I	670	26°C	Aerobico	MA	Fictibacillus arsenicus; B3; GQ304784	962
C82	Branca, pequena, lisa, brilhante	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB BH + Óleo	Fictibacillus arsenicus; Asd12; JQ030916	971
C84	Bege, fosca	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	Insolúve 1 BH + Óleo	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	996
C85	Bege, fosca, lisa, circular	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	Insolúve 1	Pseudoalteromonas arabiensis; M8C_0m_04; KM041222	990
C89	Bege, transparente, lisa, brilhante, ceircular	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	MA 50%	Alteromonas macleodii AltDE1; CP003917	984
C90	Bege, transparente, lisa, brilhante, circular, grande amarela, irregular, brilhante, lisa	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	988
C95	irregular, brilhante, lisa	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	SOB BH + Óleo	Acinetobacter sp. YNA109; JQ039977	969
C96	puntiforme, transparente, brilhante	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	Insolúve 1	Bacillus indicus; BDH3; KF933624	998
C98	bege, transparente, irregular, lisa, brilhante	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromonas sp. 01/121; AJ874345	982
C100	Transparente, liso, brilhante, circular	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. NB0059; KP770076	976
C101	Verde, leitosa, brilhante, lisa	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. K873; GU223590	995
C102	Bege, grande, leitosa, brilhante, irregular	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	MA	Vibrio sp. D1234; DQ480141	986

C103	Laranja, lisa, brilhante, circular bege,	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	MA	Tenacibaculum geojense (T); YCS-6; HQ401023	987
C104	irregular, lisa, brilhante Verde,	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	MA 50%	Vibrio sp. S575; FJ457324	981
C105	leitosa, brilhante, lisa Bege,	D. pertusum	670	26°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. K873; GU223590	982
C106	irregular, fosco, dentro do agar	S.I	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo BH + Óleo	Bacillus sp. 2P03AE; EU977669	992
C107	Puntiforme, branca bege, fosco, rugoso,	S.I	±672	26°C	Aerobico	Insolúve 1	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	976
C108	irregular	S.I	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Alteromonas sp. SI23; AB712356	991
C109	bege, fosca, circular	S.I	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	997
C110	bege, rugoso, fosco	S.I	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Alteromonas sp. SI23; AB712356	984
C111	bege, plana, fosca	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Vibrio alginolyticus; MT83; KC884633	977
C112	bege, rugosa, fosca	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	980
C113	bege, circular, fosca	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	979
C114	bege, rugoso, irregular	S.I	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Alteromonas sp. SI23; AB712356	989
C146	branca, fosca, lisa, circular	D.pertusu m	670	26°C	Aerobico	SOB	Pseudoalteromona	
C147	bege, fosca, circular, rugosa	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	s sp. An2; AJ551143	977
C148	bege, fosca, rugosa	S. variabilis	±672	26°C	Aerobico	MMM + Óleo BH + Óleo	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	992
C152	bege, brilhante, pequena, lisa	Farrea	830	26°C	Aerobico	Insolúve 1	Alteromonas alvinellae; HY757; AF288360	972
C154	bege, fosca, irregular, rugosa	Farrea	830	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	992
C155	bege claro, fosca,	Farrea	830	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Halomonas sp. BCw078; FJ889592	990

	irregular, rugosa								
C156	bege escuro, irregular, fosco	Farrea	830	26°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromonas arabiensis; M8C_0m_04; KM041222 Oceanobacillus picturae; SDZ-a; EU343723	990	
C194	bege, lisa, pequena	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	Acinetobacter lwoffii; BCHCNZ270A; HQ898860	975	
C197	bege, fosca, lisa	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	Acinetobacter baumannii; CTF711-D; KJ416382	981	
C198	bege (mais escuro), fosca, lisa	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	Acinetobacter johnsonii; 3P09AB; EU977714	952	
C199	bege, brilhante, lisa	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	uncultured Acinetobacter sp.;	977	
C200	bege, leitosa, brilhante, lisa	S.I	670	6°C	Aerobico	MA 50%	3P-3-1-M05; EU705653	100 0	
C201	laranja, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	Bacillus idriensis; M50; JF411294	982	
C202	bege, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	MA	Acinetobacter lwoffii; JUN-5; KF228924	991	
C204	bege, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	LB	Providencia vermicola; CGS6; KF886276	982	
C207	bege, irregular, rugosa, fosca	S.I	670	6°C	Aerobico	LB BH + Óleo	Acinetobacter junii; GIST-BD1; EF429000	759	
C210	bege, leitosa, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	Solúvel BH + Óleo	Acinetobacter sp. A30(2011); JN228279	978	
C211	bege, leitosa, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	Solúvel BH + Óleo	Acinetobacter lwoffii WJ10621; CM001194	990	
C212	branca, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	Insolúvel 1 BH + Óleo	Acinetobacter sp. NFM2; GQ377756	967	
C213	bege, lisa, brilhante	S.I	670	6°C	Aerobico	Insolúvel 1 BH + Óleo	Acinetobacter sp. 6-12(2010); HM489955	965	
C214	bege, leitosa, brilhante, lisa	S.I	670	6°C	Aerobico	Insolúvel 1	Acinetobacter sp. 5g; EU916711	979	

C215	bege, leitosa, brilhante, lisa	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Vibrio gigantis; S-9; JF412221	982
C216	bege, transparente, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Vibrio sp. E505-4; FJ169981	979
C217	bege, leitosa, brilhante, lisa	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Pseudoalteromonas sp. 2SHT; KC884676	972
C218	bege, transparente, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Vibrio gigantis; S-19; JF412225	984
C219	bege escuro, leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Vibrio sp. sw0106-15; KT276381	976
C221	bege, rugosa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	LB	Photobacterium leiognathi; SN2B; AY292951	989
C222	bege, rugosa, brilhante, irregular	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	LB	Photobacterium leiognathi; SN2B; AY292951	972
C223	bege, brilhante, lisa	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	LB	Photobacterium leiognathi; SN2B; AY292951	971
C230	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. LW001.02; HM012748	990
C231	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio splendidus; W208; JF836192	979
C232	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio splendidus; W048; JF836191	987
C233	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. 57B112Y11; KC815755	975
C234	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio gigantis; S-31; JF412227	993
C236	leitosa, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	TCBS	Vibrio sp. E505-4; FJ169981	989
C239	bege, fosca, irregular	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA	Vibrio sp. gq; EF187006	983
C241	branca, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromonas sp. BSi20580; DQ665801	983
C242	bege, leitosa, brilhante, lisa	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromonas sp. INTCD224H; AB274752	985
C243	bege, leitosa, brilhante, lisa	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromonas sp. BSs20039; EU365536	973
C244	bege, transparente, lisa, brilhante	D. pertusum	670	6°C	Aerobico	MA 50%	Vibrio sp. E505-4; FJ169981	981
C246	bege, rugosa, irregular	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	992

C247	branca, fosca, puntiforme	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromona s sp. NI05; JN388609	992
C248	branca, fosca, lisa bege, irregular, fosca	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	982
C249	branca, fosca, lisa bege, irregular, fosca	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	MMM + Óleo	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	982
C252	bege, leitosa, lisa, brilhante branca, leitosa, pequena, lisa	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	MA 50% BH + Óleo	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	985
C254	branca, leitosa, pequena, lisa	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	Óleo Solúvel	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	984
C255	branca, leitosa, pequena, lisa	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Alteromonas sp. V4.BE.32; V4.BE.32 = MM_2275; AJ244758	970
C256	branca, leitosa, pequena, lisa	S. variabilis	±672	6°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	965
C258	branca, pequena, lisa	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	992
C260	branca, pequena, lisa	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Halomonas aquamarina (T); DSM 30161; AJ306888	991
C261	branca, pequena, lisa	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	978
C267	bege, lisa, brilhante	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	986
C268	bege, lisa, brilhante branca, fosca, regular, pequena	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	MA 50%	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	979
C270	branca, fosca, regular, pequena	Coral Negro	±672	6°C	Aerobico	Coral Juice	Halomonas sp. WP5m-10; JX533686	972
C271	laranja, lisa, brilhante	Coral Negro	±672	6°C	Aerobico	R2A	Curtobacterium sp. NJ-10; AM396911 = Flavobacterium Acinetobacter sp.	995
C10B	bege, lisa, brilhante	S.I	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose	18III/A01/072; AY576723	986
C10R		S.I	670	26°C	Aerobico	SOB + Glicose	Oceanobacillus sp. SB123; EU308470	973
C113.1		Coral Negro	670	26°C	Aerobico	Coral Juice	Vibrio alginolyticus; MT83; KC884633	983

C264.1	bege, brilhante, rugoso	D. pertusum	±672	6°C	Aerobico	MMM + Óleo BH + Óleo	Pseudoalteromona s sp. An2; AJ551143	989
C97.1		D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	Solúvel	Pseudoalteromona s sp. 01/121; AJ874345	991
C97.2	puntiforme, transparente, fosca	D. pertusum	±672	26°C	Aerobico	BH + Óleo Solúvel	Halomonas meridiana (T); DSM 5425; AJ306891	983

9.3 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE ÁGUA

ID	Morfologia	Fonte	Prof. (~)	Temp. (°C)	Aerobico/ anaerobico	Meio	Best match	%
A177	Bege, transparente, borda irregular, brilhante	Água	±672	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Pseudoalteromonas sp. An2; AJ551143	984
A179	Bege, lisa, brilhante, circular Bege transparente, lisa	Água	±672	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Alteromonas macleodii str. 'English Channel 673'; CP003844	979
A180	Bege, brilhante, rugoso, irregular	Água	±672	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Alteromonas alvinellae; HY757; AF288360	971
A181	Rosa, borda irregular, brilhante, lisa	Água	±672	26°C	Aerobic	MMM + Óleo	Pseudoalteromonas mariniglutinosa; LAMA 940; KC583221	989
A183	Rosa, borda irregular, brilhante, lisa	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Bacillus aquimaris; MKSC 6.2; HM044219	979
A184	Rosa, borda irregular, brilhante, lisa	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Bacillus aquimaris; MKSC 6.2; HM044219	984
A186	Laranja, brilhante, lisa, circular	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Vitellibacter sp. 2- 4; JN942140	963
A187	Bege grande, lisa, borda irregular	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Pseudoalteromonas sp. A28; AF227238	991
A188	Laranja escuro, lisa, brilhante	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Erythrobacter sp. xn109; KJ702693	988
A189	Amarela, grande, lisa,	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Sufflavibacter litoralis; IMCC 1001; DQ868538	966

A190	circular, brilhante Laranja, lisa, brilhante,	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Erythrobacter sp. MOLA 124; AM990898	1000
A191	circular Laranja, lisa, brilhante,	água	670	26°C	Aerobic	MA 50%	Erythrobacter citreus; F75113; HQ908700	970
A192	Branco, lisa, brilhante, circular	Água	670	26°C	Aerobic	MA 50%	Bacillus acidicola (T); 105-2; AF547209	842
A419	Branca, lisa, brilhante Bege, grande, leitosa, brilhante,	Água	±672	26°C	Aerobic	MA 50%	Bacillus sp. GB02- 2A; DQ079008	958
A422	lisa Bege, brilhante,	Água	670	26°C	Aerobic	MA	Photobacterium lipolyticum (T); M37; AY554009	932
A424	liso Bege, claro, brilhante	Água	670	26°C	Aerobic	MA 50%	Aurantimonas coralida; DSM 14790; LC066373	988
A425	liso	Água	670	26°C	Aerobic	BH + Óleo Solúvel	Halomonas sp. R18-1; KT340487	970

9.4 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE SEDIMENTO

ID	Morfologia	Fonte	Prof. (~)	Temp. (°C)	Aerobico/ anaerobico	Meio	Best match	%
S157	amarelo, brilhante, circular, liso	Sedimento	670	26°C	Aerobic	MA	Halobacillus yeomjeoni (T); MSS- 402; AY881246	979
S162	branca, leitosa, brilhante, lisa	Sedimento	830	26°C	Aerobic	MA	Bacillus subtilis; NC1; AB701293	995
S172	bege clara, irregular, lisa, brilhante	Sedimento	830	26°C	Aerobic	R2A	Bacillus sp. DS3; KJ817210	974
S173	amarela clara, lisa, brilhante, circular	Sedimento	830	26°C	Aerobic	R2A	Staphylococcus pasteuri; CV5; AJ717376	998

9.5 TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS ANAERÓBIOS

ID	Morfologia	Fonte	Prof . (~)	Temp . (°C)	Aerobico/ anaerobico	Meio	Best match	%
AN1	Marrom clara, brilhante, lisa, grande	Calyx sp.	830	6°C	Anaerobic	MB20	Moritella viscosa; LN554852	982
AN2	Marrom clara, centro escuro, lisa, brilhante	Calyx sp.	830	6°C	Anaerobic	MB20	Photobacterium sp. SS12.10; KC160903	904
AN3	Marrom clara, centro escuro, lisa, brilhante	Calyx sp.	830	6°C	Anaerobic	MB20	Vibrio sp. gq; EF187006	969
AN4	Branca, fosca, lisa	Calyx sp.	830	6°C	Anaerobic	MB20	Pseudomonas sp. MBIC2027; O6S2-1; AB030085	964
AN5	Rosa clara, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Pseudoalteromonas sp. WINTA324h; AB274777	969
AN6	Rosa pink, pequena, circular, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Palleronia abyssalis (T); 221-F1; KJ638253	953
AN7	Bege salmao, lisa, brilhante, grande	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Pseudoalteromonas sp. wp32; AJ551109	970
AN8	Salmao, lisa, brilhante, borda transparente	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Shewanella pneumatophori (T); SCRC-2738; AB204519	970
AN9	Pequena, circular, bege, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Shewanella algae; MARS 14; LN795823	960
AN10	Amarela, lisa brilhante	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Bacillus sp. ECSMB41; KM369846	973
AN11	Salmao, lisa, brilhante	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Marinobacter hydrocarbonoclasticus ATCC 49840; FO203363	992
AN12	Bege salmao, lisa,	Pocillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20	Pseudoalteromonas sp. J104; EU143362	971

	brilhante, grande							Jeotgalibacillus marinus; ATCC29841; AB021190	904
AN1 3	Transparente, brilhante, lisa		830	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium indicum; SE4; AY771742	962
AN1 4	Bege, brilhante, lisa, circular	Poecillastra laminaris	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium sp. P65; EU864266	859
AN1 5	Bege clara, lisa, brilhante, circular	Poecillastra laminaris	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium indicum; SE4; AY771742	942
AN1 6	Bege escuro, lisa e brilhante	Poecillastra laminaris	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium profundum; 3TCK; DQ027054	956
AN1 7	Bege amarelado, leitosa, lisa, brilhante	Poecillastra laminaris	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium frigidiphilum (T); SL13; AY538749	100 0
AN1 8	Bege escuro, lisa, brilhante	Poecillastra laminaris	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Photobacterium sp. SL62; AY538750	952
AN1 9	bege, borda transparente, lisa, brilhante	Poecillastra laminaris	830	6°C	Anaerobic	MB20		Pontivivens insulae (T); GYSW-23; KP662553	796
AN2 1	Branca, lisa, circular, brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MB20			
AN2 2	Marrom fosca, circular, borda transparente, brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MB20		Vibrio sp. D1234; DQ480141	987
AN2 3	bege, leitosa, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Pseudoalteromon as sp. wp32; AJ551109	964
AN2 4	Rosa escuro, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MB20		Rhodobacteracea e bacterium E13; KJ786459	968
AN2 6	Acinzentado , lisa, brilhante, circular	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MB20		Pseudoalteromon as sp. An2; AJ551143	950
AN2 7	Rosa claro, lisa,	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MB20		Pseudoalteromon as sp. An2; AJ551143	985

AN2 8	brilhante, mucosa marrom clara, lisa, brilhante Cinza, circular, brilhante, lisa	Pachastrell a caliculata	672	6°C	Anaerobic	MB20	Vibrio sp. S4074; FJ457586	933
AN2 9	Bege, leitosa, grande, mucosa Rosa claro, lisa, brilhante Bege clara, borda transparente, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MB20	Photobacterium sp. MOLA 61; AM990836 Pseudoalteromon as shioyasakiensis; SMJ25; KT036405	952
AN3 3	Bege, lisa brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MMMF	Rhodobacteracea e bacterium E13; KJ786459	953
AN3 4	Bege, lisa brilhante	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MMMF	Moritella sp. J28; AB011356	985
AN3 5	Amarela, lisa, fosca, circular	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MB20	Vibrio sp. S4074; FJ457586	974
AN3 6	Alaranjada, transparente, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	672	6°C	Anaerobic	MMMF	Photobacterium phosphoreum; AK5; AY345890	798
AN3 7	amarelo claro, liso, brilhante Laranja claro, rugoso, borda irregular, fosca bege, transparente, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MMMF	Shewanella sp. VS-7; FJ497707 Oceanospirillacea e bacterium 2CH8; HG004168	952
AN3 8	Bege, leitosa, grande, mucosa Rosa claro, lisa, brilhante Bege clara, borda transparente, lisa, brilhante	Pachastrell a caliculata	±672	6°C	Anaerobic	MMMF	Aliivibrio wodanis; AF329728	806
AN4 2	Bege, lisa brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MMM A	Moritella sp. J13; AB011355	986
AN4 3	Borda irregular, bege, brilhante	Pachastrell a caliculata	830	6°C	Anaerobic	MMM A	Vibrio sp. 2197; HF549237	937

9.5 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

9.5.1 *MetM*

Componentes	Quantidade
Sal mineral de nitrato (NMS)*	1L
Solução fosfato***	10mL
Solução de vitaminas****	10mL
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.4 mg/L (for 10 µM)
NaCl	1.5%

Nitrate Mineral Salts (NMS)*	
Componentes	Quantidade (por litro)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
KNO ₃	1.0 g
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.2 g
3.8% (w/v) solução Fe-EDTA	0.1 ml

0.1% (w/v) NaMo•4H ₂ O	0.5 ml
<u>Solução de elementos-traço</u> (IX)**	1.0 ml
Agar Nobre (se desejar meio sólido)	15 g

Solução de elementos-traço (IX)**	
Componentes	Quantidade (por litro)
FeSO ₄ •7H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	400 mg
MnCl ₂ •7H ₂ O	20 mg
CoCl ₂ •6H ₂ O	50 mg
NiCl ₂ •6H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃ (ácido bórico)	15 mg
EDTA	250 mg

Solução fosfato***	
---------------------------	--

Componentes	Quantidade (por litro)
KH ₂ PO ₄	26 g
Na ₂ HPO ₄ •7(H ₂ O)	62 g

Solução de vitaminas****	
Componentes	Quantidade (por litro)
Biotina	2.0 mg
Ácido fólico	2.0 mg
Tiamina HCl	5.0 mg
Cálcio pantotenato	5.0 mg
Vitamina B12	0.1 mg
Riboflavina	5.0 mg
Nicotiamida	5.0 mg

Pré-preparo da solução de elementos-traço (1X)**

→ Adicionar todos os componentes para NMS*, incluindo a solução de elementos-traço**, em 700 mL de água destilada e diluir.

→ Então adiciona 1.5% de NaCl (concentração final)

→ Então completa a solução com água, até atingir 1000 mL. Segue então com a autoclavagem do meio e só depois adiciona os seguintes componentes:

- (i) 10 ml/L de solução fosfato*** autoclavada.
- (ii) 10 ml/L da solução de vitaminas****, esterilizada por filtração em membrana 0.2 μm .
- (iii) 1.4 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (para 10 μM)

9.5.2 MB20

Componentes	Quantidade
Marine Broth 2216	18.7 g
Água do mar natural estéril (NSW)	1 L
Agar Nobre	15 g
SiO_2 (0.5-10 μm)	25 g

→ Adicionar todos os constituintes em 1L de água destilada e autoclavar.

9.5.3 MMM + hidrocarbonetos específicos

Componentes	Quantidade
NaCl	20 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.3 g
KCl	0.7 g

CaCl ₂	1.25 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ *5H ₂ O	5 mg
K ₂ HPO ₄	75mg
Glutamato de sódio	2 g
Tris base	6.1 g
Agar Nobre	15 g

Carboidratos específicos	
Componentes	Quantidade
Fucose	0.5 g
Arabinose	0.5 g

→ Adicionar todos os constituintes em 1 L de água destilada e autoclavar.

9.5.4 MMM + hidrocarbonetos (filtro de papel)

Componentes	Quantidade
MMM (ver N°9.5.3)	1 L

Petróleo	1%
----------	----

→ Placas MMM normais onde as amostras forem inoculadas. Em seguida, vire a placa de cabeça para baixo e coloque na tampa um papel de filtro saturado de óleo sobre ele, com proporções de placas de Petri. Isso irá evaporar lentamente os hidrocarbonetos de cadeia curta (HC) em direção ao ágar e torná-los disponíveis para o inóculo. Provavelmente será necessário reabastecer o óleo de vez em quando.

9.5.5 BH + óleo (insolúvel)

Componentes	Quantidade
BH em pó	3.27 g
Agar	15 g
Água destilada	1L
Fração de óleo insolúvel*	1%

Coloque o óleo em solução salina (1: 1) e agite o overnight.

→ A fase aquosa será a fração solúvel e os borrões são a fração insolúvel.

Adicionar 3,8 g de BH em pó em 1L de água destilada e autoclavar. Em seguida, adicionar 1% (volume final) da fração de óleo insolúvel.

9.5.6 BH + óleo (solúvel)

Componentes	Quantidade
BH em pó	3.27 g
Agar	15 g
Água destilada	1L
Fração solúvel do óleo	1%

Adicionar 3,8 g de BH em pó em 1L de água destilada e autoclavar. Coloque 1% da fração de óleo solúvel (ver * do N° 5) no meio de cultura fundido.

9.5.7 Medium A

Componentes	Quantidade
Água destilada	250 mL
NSW	750 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.32 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	200 mg
CaCl ₂ •2H ₂ O	20 mg
K ₂ HPO ₄	114 mg

Ferro quelado (13%)	130 mg
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1 µg
MnCl ₂ •4H ₂ O	2 µg
CoCl ₂ •6H ₂ O	2 µg
CuSO ₄ •5H ₂ O	20 µg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	100 µg
Vermelho fenol (0,04%)	3.25 mL
pH	7.8

9.5.8 TCBS

Componentes	Quantidade
TCBS em pó	89 g
Água destilada	1 L

→ Adicionar 89g de TCBS em pó em 1 litro de água destilada e, em seguida, levar lentamente à ebulição, mexendo com agitação constante até a dissolução completa. Resfrie a 50 ° C e despeje em placas de Petri estéreis. Aqueça até ferver e espere 1 minuto. NÃO autoclave este meio de cultura.

9.5.9 R2A

Componentes	Quantidade
R2A em pó	18.2 g
Água destilada	1 L

→ Adicionar 18,2 g de R2A em pó em 1 L de água destilada e depois autoclavar.

9.5.10 MA

Componentes	Quantidade
MA em pó	55.1 g
Água destilada	1L

→ Adicionar 55,1 g de MA em pó em 1 L de água destilada e depois autoclavar.

9.5.11 MA 50%

Componentes	Quantidade
MA em pó	27.55 g
Água destilada	1 L

→ Adicionar 27,55 g de MA em pó em 1 L de água destilada e depois autoclavar.

9.5.12 MMM + Coral Juice

Componentes	Quantidade
--------------------	-------------------

MMM (ver N° 9.5.3)	1 L
Coral juice	Ver preparo em (i.i)

→ Depois de autoclavado, adiciona coral juice.

(i.i) Coral Juice

Schultz and Modolon et al. (in prep.) → “Briefly, collected coral’s fragment (1 g) is grinded with sterile mortar and pestle until obtaining a homogeneous mixture. Resuspend the macerated coral in 9 ml of saline 2.5% (to mimic the concentration of seawater salinity) and 5 mm glass beads, and incubate overnight in an orbital shaker at 120 rpm and at room temperature. Subsequently, after incubation, centrifuge at 10,000 g for 5 minutes and collect the supernatant. Due to high amounts of mucus, which is rich in sugars that can caramelize in the autoclaving process, autoclave is not recommended. In this way, successive filtration steps, starting with 1 to 0.22 μm , are required. This process allows the sterility of the Coral Juice. The recovered and filtered supernatant is the Coral Juice. After that, with the Marine Minimal Medium (see formulation described by Solano et al. 2000) removed from the autoclave and wait for the temperature decrease (around 70°C), and then, add 5% of Coral Juice in 1000 ml of media, followed by mixing the blend and plating 20 ml in each Petri dish. To ensure sterility, we strongly recommend to keep the plated Petri dishes with Coral Juice culture medium at room temperature for at least 24 hours before using them.”

ATENÇÃO. Não autoclavar o Coral Juice, pois ele possui altas quantidades de muco, o qual é rico em açúcares que podem caramelizar no processo de autoclavagem. Também não é possível filtrar o Coral Juice para esterilização, pois o muco impede a filtração. Portanto, é necessário manter as placas em temperatura ambiente por pelo menos 24h antes de usá-las, para garantir esterilidade.

9.5.13 *Ammonia oxidizer*

Componentes	Quantidade
-------------	------------

NH ₄ Cl	228 mg
NaCl	116 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40.0 mg
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	73.0 mg
KCl	38.0 mg
KH ₂ PO ₄	34.0 mg
FeCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	24 µg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24 µg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	17 µg
ZnCl ₂	68 µg
Na ₂ MoO ₄	24 µg
H ₃ BO ₃	62 µg
Vermelho fenol	0.5 mg L

Ajustar NaCl (34.9 ppt? - 3.49%)	
Água destilada	1 L
pH 7.8	

→ Adicione todos os constituintes em 1 litro de água destilada. Ajuste para pH 7,8 e então autoclavar.

9.5.14 K medium + metanol

Componentes	Quantidade
KH ₂ PO ₄	2.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
NaCl	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.002 g (2 mg)
MeOH (metanol)	(0.5% v/v)
pH 7.4	

→ Adicione todos os constituintes a 1 L de água destilada, com exceção do metanol (MeOH) e, em seguida, autoclavagem.

→ Adicione 0,5% v/v de MeOH antes da inoculação - o solvente pode evaporar.

9.5.15 SOB e SOB + glicose

Constituintes	Quantidade
Na ₂ S ₂ O ₃	5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
NaHCO ₃	0.2g
NH ₄ Cl	0.1g
Água destilada	1000 mL
Agar	15g
pH	8.0
Glicose (heterotróficas)	5.0g
Púrpura de bromocresol (indicador de pH)	

→ Todos os componentes devem ser autoclavados juntos. Para o isolamento de heterotróficos, a glicose deve ser adicionada à composição. Para autotrófico, o meio deve ser formulado sem glicose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acinas, Silvia G. Acinas, Sánchez, Pablo Sánchez, Salazar, Guillem Salazar, Cornejo-Castillo, Francisco M. Cornejo-Castillo, Sebastián, Marta Sebastián, Logares, Ramiro Logares, Sunagawa, Shinichi Sunagawa, Hingamp, Pascal Hingamp, Ogata, Hiroyuki Ogata, Lima-Mendez, Gipsi Lima-Mendez, Roux, Simon Roux, González, José M. González, Arrieta, Jesús M Arrieta, Alam, Intikhab S. Alam, Kamau, Allan Kamau, Bowler, Chris Bowler, Raes, Jeroen Raes, Pesant, Stéphane Pesant, Bork, Peer Bork, Agustí, Susana Agustí, Gojobori, Takashi Gojobori, Bajic, Vladimir Bajic, Vaqué, Dolores Vaqué, Sullivan, Matthew B. Sullivan, Pedrós-Alió, Carlos Pedrós-Alió, Massana, Ramon Massana, Duarte, Carlos M. Duarte, Gasol, Josep M. Gasol. (2019). "Metabolic Architecture of the Deep Ocean Microbiome". *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/635680>.

Aoki, Masataka, Ehara, Masayuki, Saito, Yumi, Yoshioka, Hideyoshi, Miyazaki, Masayuki, Saito, Yayoi, Miyashita, Ai, Kawakami, Shuji, Yamaguchi, Takashi, Orashi, Akiyoshi, Nunoura, Takuro, Takai, Ken e Imachi, Hiroyuki. (2014). "A long-term cultivation of an anaerobic methane-oxidizing microbial community from deep-sea methane-seep sediment using a continuous-flow bioreactor." *PloS ONE* Vol. 9, no. 8, pp. (August):e105356. 10.1371/journal.pone.0105356.

Arrigo, Kevin R. (2005). "Marine microorganisms and global nutrient cycles." *Nature* Vol. 437, no. 15, pp. (September): 349-355. <https://doi.org/10.1038/nature04159>.

Astudillo-García, Carmen, Bell, James J., Montoya, Jose M., Moitinho Silva, Lucas. Thomas, Torsten, Webster, Nicole S. E Taylor, Michael W. (2020). Assessing the strength and sensitivity of the core microbiota approach on a highly diverse sponge reef. *Environmental Microbiology*. Vol. 22(9), pp. 3985-3999.

Auscavitch, Steen R., Lunden, Jay J., Barkman, Alexandria, Quattrini, Andrea M, Demopoulos Amanda W. J. e and Cordes, Erik E. (2020). "Distribution of deep-water scleractinian and stlyasterid corals across abiotic environmental gradients on three seamounts in the Anegada Passage". *PeerJ* Vol.8, pp. (July):1-25. DOI 10.7717/peerj.9523

Bayat, Zeynab, Hassanshahian, Mehdi e Hesni, Majid Askari. (2015). "Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf." *Marine Pollution Bulletin* Vol. 101, pp. (November): 85-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.021>.

Beazley, Lindsay, Kenchington, Ellen, Murillo, Francisco J., Brickman, David, Wang, Zeliang, Davies, Andrew J., Roberts, Emyr M. e Rapp, Hans T. (2021). Climate change winner in the deep sea? Predicting the impacts of climate change on the distribution of the glass sponge *Vazella pourtalesii*. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 657, pp. 1-23.

Bernardino, Angelo F., Berenguer, Vanessa Berenguer, e and Ribeiro-Ferreira, Venina P. Ribeiro-Ferreira. 2016. "Bathymetric and Regional Changes in Benthic Macrofaunal Assemblages on the Deep Eastern Brazilian Margin, SW Atlantic." *Deep-Sea Research I* 111, pp. (February): 110-120. 10.1016/j.dsr.2016.02.016.

Bosch, Thomas C. G. e McFall-Ngai, Margaret J. (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology (Jena)* 114, no. 4, pp. (Sep): 185-190. 10.1016/j.zool.2011.04.001.

Bourne, David G., Morrow, Kathleen M. e Webster, Nicole S. (2016). "Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the health and resilience of reef ecosystems." *Annual Review of Microbiology* Vol. 70, pp. (September): 317-340. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440>.

- Bowman, John P. (2007). "Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*." *Marine Drugs* Vol. 5, pp. (December):220-241. [10.3390/md504220](https://doi.org/10.3390/md504220).
- Bowman, John P., McCammon, Sharee A. McCammon, Nichols, David S. Nichols, Skerratt, Jenny H. Skerratt, Rea, Suzanne M. Rea, Nichols, Peter D. Nichols, e and McMeekin, Tom A. McMeekin. (1997). "Shewanella gelidimarina sp. nov and Shewanella frigidimarina sp. nov., Novel Antarctic Species with the Ability To Produce Eicosapentaenoic Acid (20:5 ω 3) and Grow Anaerobically by Dissimilatory Fe(III) Reduction." *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, no. 4,pp. (October): 1040-1047.0020-7713/97/\$04.00 + 0.
- Brown, B. E. (1996). "Coral bleaching: causes and consequences." *Coral Reefs* 16, pp. (November): S129-S138. <https://doi.org/10.1007/s003380050249>.
- Carballo, J.L., Bell, J.J. (2017). "Climate Change and Sponges: An Introduction" . In: Carballo,J., Bell, J. (eds) *Climate Change, Ocean Acidification and Sponges*. (Springer, Cham). https://doi.org/10.1007/978-3-319-59008-0_1
- Cárdenas, Paco e Rapp, Hans T. (2013). Disused spiculoenesis in deep-water Geodiidae (Porifera, Demospongiae) growing in shallow waters. *Invertebrate Biology*. Vol. 132(3), pp. 173-194.
- Cerqueira, Laura, Azevedo, Nuno F., Almeida, Carina, Jardim, Tatiana, Keevil, Charles William e Vieira, Maria J. (2008). "DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)." *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 9, pp. (October):1944-1960. [10.3390/ijms9101944](https://doi.org/10.3390/ijms9101944).
- Cesar, D. E., and P. C. Abreu. (2001). "Ecology of Aquatic Microorganisms in Southern Brazil:State of Art." *Aquatic Microbial Ecology in Brazil* 9:153-172. [10.4257/305](https://doi.org/10.4257/305).
- Cheng, Shuhua, Li, Na, Jiang, Li, Xu, Baiheng e Zhou, Weizhi. (2019). "Biodegradation of metal complex Naphtol Green B and formation of iron-sulfur nanoparticles by marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CF10-13." *Bioresource Technology* Vol. 273, pp. (October): 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.082>.
- Chevaldonné, Pierre, Desbruyères, Daniel e Le Haître, Michael. (1991). Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Research*. Vol. 38, no. 11, pp. 1417-1430.
- Costello, Mark J., eand Chaudhary, Chhaya Chaudhary. (2017). "Marine Biodiversity, Biogeography, Deep- Sea Gradients, and Conservation." *Current Biology Review* 27, no. R511, pp. (June): 17.
- Danovaro, Roberto, Dell'Anno, Antonio Dell'Anno, e and Pusceddu, Antonio Pusceddu. (2004). "Biodiversity Responde to Climate Change in a Warm Deep-Sea." *Ecology Letters* 7, pp. (July): 821-828. [10.1111/j.1461-0248.2004.00634.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00634.x).
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., e& Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 103, pp. 80-100.
- De Leo, Fabio C., Bernadino, Angelo F. Bernadino, eand Sumida, Paulo Y. Sumida. (2020). "Continental Slope and Submarine Canyons: Benthic Biodiversity and Human Impacts." In *Brazilian Deep-SeaBiodiversity*, (Springer) pp. 37 - 72. N.p.: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53222-2_3.
- de Voogd, N.J.; Alvarez, B.; Boury-Esnault, N.; Carballo, J.L.; Cárdenas, P.; Díaz, M.-C.; Dohrmann, M.; Downey, R.; Hajdu, E.; Hooper, J.N.A.; Kelly, M.; Klautau, M.; Manconi, R.; Morrow, C.C. Pisera,

A.B.; Ríos, P.; Rützler, K.; Schönberg, C.; Vacelet, J.; van Soest, R.W.M. (2022). World Porifera Database. Acessado em: <https://www.marinespecies.org/porifera>. 2022-12-17.

Deming, Jody W. and Baross, John A. (2000). “Survival, dormancy, and nonculturable cells in extreme deep-sea environments”. In: Colwell, R.R., Grimes, D.J. (eds) *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. (Springer, Boston, MA). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0271-2_10

Demopoulos, Amanda. (2016). “Impacts of the Deepwater Horizon oil spill on deep-sea coral-associated sediment communities.” *Marine Ecology Progress Series* 561, pp. (Dec): 51-68. [10.3354/meps11905](https://doi.org/10.3354/meps11905).

Dick, Gregory J., Anantharaman, Karthik, Baker, Brett J., Li, Meng, Reed, Daniel C. e Sheik, Cody S. (2013). The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Front. Microbiol.* Vol. 4(124), pp. 1-16.

Dohrmann, Martin, Janussen, Dorte, Reitner, Joachin, Collins, Allen G. and Wörrheide, Gert. (2008). “Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida)”. *Syst. Biol.* 57, no. 3, pp. (June): 388-405. <https://doi.org/10.1080/10635150802161088>.

Drozdov, A. L. e and Karpenko, A. A. (2013). “Spicules of hexactinellid sponges (Hexactinellida: Porifera) as natural composite materials”. *Russian Journal of Marine Biology* 39, no.4, pp. (November): 229-237. Doi: [10.1134/S1063074013040044](https://doi.org/10.1134/S1063074013040044).

Duarte, Gustavo A., Villela, Helena D. Villela, Deocleciano, Matheus Deocleciano, Silva, Denise Silva, Barno, Adam Barno, Cardoso, Pedro M. Cardoso, Vilela, Caren L. S., Rosado, Phillipe, Messias, Ca,ila S.M., Chacon, Maria Alejandra, Santoro, Erika P., Olmedo, Daniele B., Szpilman, Marcelo, Rocha, Luiz A., Sweet, Michael e Peixoto, Raquel S. Vilela, et al. (2020). “Heat Waves Are a Major Threat to Turbid Coral Reefs in Brazil.” *Frontiers in Marine Science* 7, no. 179, (March)pp.: 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00179>.

Ducklow, Hugh W., Steinberg, Deborah K. e, Buesseler, Ken O. (2001). “Upper Ocean Carbon Export and the Biological Pump.” *Oceanography* Vol. 14, no. 4, pp.: 50-58. [10.5670/oceanog.2001.06](https://doi.org/10.5670/oceanog.2001.06).

Egan, Suhelen, James, Sally, Holmström e Kjelleberg, Staffan. (2002). “Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*.” *Environmental Microbiology* Vol. 4, no. 8, pp. (April):433-442. [10.1046/j.1462-2920.2002.00322.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00322.x).

Esteves, A. I., Amer, N., Nguyen, M e Thomas, T. (2016). “Sample processing impacts the viability and cultiability of the sponge microbiome.” *Frontiers in Microbiology* 7, pp. (April):1- 17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00499>.

Fox, George E., Pechman, Kenneth R. eand Woese, Carl R. (1997). “Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics”. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27, no. 1, pp. . (January): 44-57.. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-1-44>

Fujitani, H., Kumagau, A., Ushiki, N., Momiuchi, K. e Tsunesa, S. (2015). “Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies.” *Frontiers in Microbiology* 6,pp. (October):1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01159>.

Galand, Pierre E., Chapron, Leila, Meistertzheim, Anne Leila, Peru, Erwan e Lartaud, Franck. (2018). “The effect of captivity on the dynamics of active bacterial communities differs between two deep-sea coral species.” *Front. Microbiol.* Vol. 9, no. 2565, pp. (October):1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02565>.

- Galkiewicz, Julia P., Pratte, Zoe A., Gray, Michael A. e Kellogg, Christina A. (2010). “Characterization of culturable bacteria isolated from the cold-water coral *Lophelia pertusa*.” *FEMS Microbiol Ecol* Vol. 77, pp. (November):333-346. 10.1111/j.1574-6941.2011.01115.x.
- Gammon, Malindi J., Tracey, Dianne M., Marriot, Peter M., Cummings, Vonda J. eand Davy, Simon K. (2018). “The physiological response of the deep-sea coral *Solenosmilia variabilis* to ocean acidification”. *PeerJ*. (July) 20;6, pp. :e5236. doi 10.7717/peerj.5236.
- Garel, Marc, Bonin, Patricia, Martini, Séverine, Guasco, Sophie, Roumagnac, Marie, Bhairy, Nagib, Armougom, Fabrice e Tamburini,Christian. (2019). “Pressure-retaining sampler and high-pressure systems to study deep-sea microbes under *in situ* conditions.” *Front.Microbiol.* Vol. 10, no. 453, pp. (April): 1-13.
- Gärtner, Andrea. Blümel, Martina, Wiese, Jutta e Imhoff, Johannes F. (2011). “Isolation and characterization of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea.” *Antonie van Leeuwenhoek* Vol. 100, pp. (June): 421-435. 10.1007/s10482-011-9599-5.
- Gauthier, G., Gauthier, M. e Christen R. (1995). “Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations.” *International Journal of Systematic Bacteriology* Vol. 45, no. 4, pp. (October): 755755-761. 10.1099/00207713-45-4-755.
- Glasl, Bettina, Smith, Caitlin E., Bourne, Daid G. eand Webster, Nicole S. (2018). “Exploring the diversity-stability paradigm using sponge microbial communities”. *Scientific Reports* 8, no. 8425, pp. (May): 1-9. DOI:10.1038/s41598-018-26641-9
- Goeij, Jasper M. de; Oevelen, Dick van; Vermeij, Mark J. A.; Osinga, Ronald; Middelburg, Jack J.; Goeij, Anton F. P. M. de; Admiraal, Wim. 2013. “Surviving in a Marine Desert: The Sponge Loop Retains Resources Within Coral Reefs.” *Science*, 342, no. 6154 (October): 108- 110. 10.1126/science.1241981
- Gómez, Carlos E., Leslie Wickes, Dan Deegan, Peter J. Etnoyer, eand Erik E. Cordes. (2018). “Growth and feeding of deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the California margin under simulated ocean acidification conditions.” *PeerJ*, no. 6ce5671, pp. (Sep), 1-23.10,7717/peerj.5671.
- González, José M. eand Whitman, William B. (2006). “*Oceanospirillum* and related genera”. *Prokaryotes*. Vol. 6, ppg. 887-915.
- Gray, Michael A., Stone, Robert P., McLaughlin, Molly R. eand Kellogg, Christina A. (2011). “Microbial consortia of gorgonian corals from Aleutian islands”. *FEMS Microbiology Ecology* 76, pp. (January): 109-120. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.01033.x.
- Gutierrez Tony, Biddle Jennifer F., Teske Andreas and Aitken Michael D. (2015). “Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of hydrocarbon-degrading bacteria in Guaymas Basin sediments”. *Frontiers in Microbiology* 6, no. 695, pp. (July): 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2015.00695.
- Han, Jian, Shin Kubota, Hiro-omi Uchida, George D. Stanley Jr., Xiaoyong Yao, Degan Shu, Yong Li, eand Kinya Yasui. (2010). “Tiny Sea Anemone from the Lower Cambrian of China.” *PLoS One* 5, no. e13276, pp. (October): 10. doi:10.1371/journal.pone.0013276.
- Hansson, Lina, Agis, Martin, Maier, Cornelia eand Weinbauer, Markus G. (2009). “Community composition of bacteria associated with cold-water coral *Madrepora oculata*: within and between colony variability”. *Marine Ecology Progress Series* 397, pp. (December): 89-102. Doi:

10.3354/meps08429.

Hoffmann, Friederike, Radax, Regina, Woebken, Dagmar, Holtappels, Moritz, Lavik, Gaute, Rapp, Hans Tore, Schappy, Marie-Lise, Schleper, Christa eand Kuypers, Marcel M. M. (2009). "Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*". *Environmental Microbiology* 11, no. 9, pp. (March): 2228 – 2243. Doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01944.x.

Hooper, John N., eand Van Soest, Rob W. Van Soest. (2002). "A Guide to the Classification of Sponges." In *Systema Porifera*. N.p.: (Springer US). 10.1007/978-1-4615-0747-5.

Horikoshi, Koki. (1998). "Barophiles: Deep-Sea Microorganisms Adapted to an Extreme Environment.." *Current Opinion in Microbiology* 1, no. 3, pp. (June): 291-295. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80032-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80032-5).

Hugenholtz, Philip, Chuvochina, Maria, Parks, Donovan H., e Soo, Rochelle M. (2021). "Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data". *The ISME Journal* 15, pp. (April): 1879-1892. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>

Jannasch, Holger W., eand Craig D. Taylor. (1984). "Deep-Sea Microbiology." *Annual Review of Microbiology* 38, no. 1, pp. (October): 487-514.

Jebbar, Mohamed, Franzetti, Bruno, Girard, Eric e, Oger, Phillippe. (2015). "Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes." *Extremophiles* 19, pp. (June):721-740. 10.1007/s00792-015-0760-3.

Kaparullina, E. N., Agafonova, N., Trotsenko, Y. A. e Doronina, N. (2018). "*Metophilus aquaticus* sp. nov., a new aerobic methylotrophic bacterium isolated from a freshwater reservoir. *Microbiology*. Vol. 87, no. 5, pp. 672-680.

Kato, Chiaki, Nogi, Yuichi eand Arakawa, Shizuka. (2008). "Isolation, cultivation and diversity of deep-sea piezophiles". In: Michiells, C., Bartlett, D.H. and Aertsen, A. (eds) *High-Pressure Microbiology*. (ASM Press, Washington, DC). Doi: [10.1128/9781555815646.ch12](https://doi.org/10.1128/9781555815646.ch12)

Kellog, Christina A. (2019). "Microbiomes of Stony and soft deep-sea corals share rare core bacteria". *Microbiome* 7, no. 90 (June): =, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0697-3>.

Kelly, Linda W., Williams, Gareth J., Barott, Katie L., Carlson, Craig A., Dinsdale Elizabeth A., Edwards, Robert A., Haas, Andreas F., Haynes, Matthew, Lim, Yan Wei, McDole, Tracey, Nelson, Craig E., Sala, Enric, Sandin, Stuart A., Smith, Jennifer E., Vermeij, Mark J.A., Youle, Merry e Rohwer, Forest. (2014). "Local genomic adaptation of coral reef-associated microbiomes to gradients of natural variability and anthropogenic stressors" *PNAS* Vol. 111, no. 28, pp. (July):1022-10232. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403319111>.

Kennedy, Jonathan, Flemer, Burkhardt, Jackson, Stephen A., Morrissey, John P., O’Gara, Ferghal, e Dobson, Alan D. W. (2014). "Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges". *PLoS ONE* 9, no. 3, pp. (March): 1-13.. Doi:10.1371/journal.pone.0091092.

Keto-Timonen, Riikka, Nina Hietala, Eveliina Palonen, Anna Hakakorpi, Miia Lindström, eand Hannu Korkeala. (2016). "Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*." *Frontiers in Microbiology* 7, no. 1151, pp. (July): 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>.

Khaw, Yam Sim Khaw, Khong, Nicholas Mun Hoe Khong, Shaharuddin, Noor Azmi Shaharuddine, Yusoff, Fatimah Md. Yusoff, (2020). "A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers". *Journal of Microbiological Methods* 172:105890.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105890>.

Kitahara, Marcelo V., Cordeiro, Ralf T. Cordeiro, Barbosa, Romina Vanessa Barbosa, Pires, Débora d. Pires, eand Sumida Paulo Yokio Gomes. (2020). Brazilian Deep-sea Corals. In *Brazilian Deep-sea Biodiversity*. eds. 1 (São Paulo, Springer), pp. 73-107.

Knowlton, Nancy. (2001). "The future of Coral Reefs." *Coloquium* 98, no. 10, pp. (May): 5419- 5425. [10.1073/pnas.091092998](https://doi.org/10.1073/pnas.091092998).

Kumar, Sudhir, Stecher, Glen, Li, Michael, Knyaz, Christina e Tamura, Koichiro. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 35 (6), pp. 1547-1549.

Kushida, Yuka eand Reimer, James Davis. (2019). "Molecular phylogeny and diversity of sea pens (Cnidaria: Octocorallia: Pennatulacea) with a focus on shallow water species of the northwestern Pacific Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 131, pp. (November): 233- 244. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.10.032>.

Labella, Alejandro M., Arahal, David R., Castro, Dolores, Lemos, Manuel L. e Borrego, Juan J. (2017). "Revisiting the genus Photobacterium: taxonomy, ecology and pathogenesis." *International Microbiology* Vol. 20, no. 1, pp. (March): 1-10. doi:10.2436/20.1501.01.280.

Lane, David J., Pace, Bernadete, Olsen, Gary J., Stahl, David A., Sogen, Mitchell L., e Pace, Norman R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses". *Proc. Natl. Acad. Sci* 82, pp. (October): 6955-6959. [10.1073/pnas.82.20.6955](https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955)

Lane, David J., Pace, Bernadette, Olsen, Gary J., Stahl, David A., Sogin, Mitchell L. eand Pace, Norman R. (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), pp. 6955-6959.

Lawler, Stephanie N., Kellog, Christina A., France, Scott C., Clostio, Rachel W., Brooke, Sandra D. eand Ross, Steve, W. (2016). "Coral-associated bacterial diversity is conserved across two deep-sea *Anthonella* species". *Frontiers in Microbiology* 7, no. 758, pp. (April): 1-18. Doi: [10.3389/fmicb.2016.00458](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00458).

Leys, Sally P. e and Mackie, George O. (1997). "Electrical recording from a glass sponge". *Nature*. 387, pp. (May): 29-30. <https://doi.org/10.1038/387029b0>.

Li, Longhai, Guo, Ce, Chen, Yiting eand Chen, Yinhe. (2020). "Optimization design of lightweight structure inspired by glass sponges (Porifera, Hexacinellida) and its mechanical properties." *Bioinspir. Biomim.* 15, pp. (March):1-18. <https://doi.org/10.1088/1748-3190/ab6ca9>

Liao, Baolin, Junjie Wang, Baohua Xiao, Xiaodong Yang, iqiand Xie, Dongdong Li, eand Chengyong Li. (2021). "Effects of acute microplastic exposure on physiological parameters in *Tubastrea aurea* corals." *Marine Pollution Bulletin* 165, no. 112173, pp. (Feb): 1-7. Contents lists available at ScienceDirect Marine Pollution Bulletin journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112173>.

Lindstrom, Mary E. (1988). "Isolation and characterization of marine methanotrophs." *Antonie na Leeuwenhoek* 54, pp. (May): 189-199. <https://doi.org/10.1007/BF00443577>.

Longhurst, Alan R. eE Harrison, W.Glen. (1989). "The biological pump: Profiles pof plankton production and consumption in the upper ocean." *Progress in Oceanography* Vol. 22, 1, pp. : 47-123. [https://doi.org/10.1016/0079-6611\(89\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0079-6611(89)90010-4).

Ludwig, W. eand Schleifer, K.H. (1994). "Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis". *FEMS Microbiology Reviews* 15, pp. (October): 155-173. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00132.x.

Macisaac, K.G., Best, M., Brugler, M.R., Kenchington, E.L.R, Anstey, L.J. eand Jordan, T. (2013). "Telophathes magna gen. Nov., spec. Nov. (Cnidaria: Anthozoa: Antipatharia: Schizopathidae) from deep waters off Atlantic Canada and the first molecular phylogeny of the deep-sea family Schizopathidae". *Zootaxa* 3700, no. 2, pp. (August): 237-258. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3700.2.3>

Mare, Molly F. (1942). "A Study of a Marine Benthic Community with Special Reference to the Microorganisms." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 25, no. 3, pp. (October): 517 - 554. <https://doi.org/10.1017/S0025315400055132>.

Maruyama, Akihiko, Honda, Daisuke, Yamamoto, Hiroyuki, Kitamura, Keiko eand Hihashihara, Takanori. (2000). "Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. Nov.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, no. 2, pp. (March): 835-846.

McClain, Caig R. e and Hardy, Sarah Mincks. (2010). "The dynamics of biogeographic ranges in the deep sea". *Proceedings of The Royal Society B*. 277, pp. (July): 3533-3546. doi: [10.1098/rspb.2010.1057](https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1057).

Mo, SagJoon, Kim, Jae-heon e Cho, Ki Woong. (2009). "A novel extracellular phospholipase C purified from a marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. J937." *Biotechnol. Lett.* Vol. 31, pp. 89(September): 89-94. [10.1007/s10529-008-9833-z](https://doi.org/10.1007/s10529-008-9833-z).

Modolon, F., A. R. Barno, H. D. Villela, eand R. S. Peixoto. (2020). "Ecological and biotechnological importance of secondary metabolites produced by coral-associated bacteria." *Journal of Applied Microbiology* 129, pp. (Jun): 1441-1457.. [10.1111/jam.14766](https://doi.org/10.1111/jam.14766).

Moi, Ibrahim Musa, Roslan, Noordiyana Nadhirah, Leow, Adam Thean Chor, Mohamad Ali, Mohd Shukuri, Abd. Rahman, Raja Noor Zaliha Raja, Rahimpour, Azam e Sabri, Suriana. (2017). "The biology and the importance of *Photobacterium* species." *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 101, pp. (May):4371-4385.. [10.1007/s00253-017-8300-y](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8300-y).

Moitinho-Silva, L., Steinert, G., Nielsen, S., Hardoim, C. C. P., Wu, Y. C., McCormack, G. P., López-Legentil, S., Marchant, R., Webster, N., Thomas, T., Hentschel, U. (2017). "Predicting the HMA- LMA Status in Marine Sponges by Machine Learning." *Front Microbiol.* 8, (May):752. doi: [10.3389/fmicb.2017.00752](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00752).

Moreno-Ulloa, Aldo, Diaz, Victoria Sicairos, Tejeda-Mora, Javier A., Contreras, Marla I. Macias, Castillo, Fernando Díaz, Guerrero, Abraham, Sanchez, Ricardo Gonzalez, Mendonza-Porras, Omar, Duhalt, Rafael Vazquez e Licea-Navarro, Alexei. (2020). "Chemical profiling provides insights into the metabolic machinery of hydrocarbon-degrading deep-sea microbes." *mSystems* Vol. 5, pp. :e00824-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems .00824-20>.

Muricy, Guilherme, Hajdu, Eduardo, Araujo, Fabio V. e Hagler, Allen N. (1993). Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Scientia Marina*. Vol. 57(4), pp. 427-432.

Nakasone, Kaoru, Ikegami, Akihiko Ikegami, Kato, Chiaki Kato, Usami, Ron Usami, eand Horikoshi, Koki. Horikoshi. (1998). “Mechanisms of Gene Expression Controlled by Pressure in Deep-Sea Microorganisms.” *Extremophiles* 2, pp. (February): 149-154. <https://doi.org/10.1007/s007920050054>.

Nawaz, Muhammad Zohaib, Sasidharan, Raghul Subin, Alghamdi, Huda Ahmed eand Dang, Hongyue. (2022). “Understanding interaction patterns within deep-sea microbial communities and their potential applications”. *Marine Drugs* 20, no. 108, pp. (January): 1-18. <https://doi.org/10.3390/md20020108>

Neulinger, Sven C., Gartner, Andrea, Järnegren, Johanna, Ludvigsen, Martin, Lotche, Karin eand Dullo, Wolf-Christian. (2009). “Tissue-associated “*Candidatus* Mycoplasma corallicola” and filamentous bacteria on the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia)”. *Applied and Environmental Microbiology* 75, no. 5, pp. (March): 1437-1444. doi:10.1128/AEM.01781-08.

Nishijima, Miyuki, Lindsay, Dhugal J., Hata, Junko, Nakamura, Aoi, Kasai, Hiroaki, Ise, Yuji, Fisher, Charles R. Fujiwara, Yoshihiro, Kawato, Masaru e, Maruyama, Tadashi. (2010). “Association of thioautotrophic bacteria with deep-sea sponges” *Mar Biotechnol* 12, pp. (March):253-260. DOI 10.1007/s10126-009-9253-7.

Oarga, Andreea. (2009). “Life in extreme environments” *Revista de Biologia e Ciências da Terra* Vol. 9, no. 1, pp. : 1-10.

Ohmae E., Gekko K., e Kato, C. (2015) Environmental Adaptation of Dihydrofolate Reductase from Deep-Sea Bacteria. In: Akasaka K., Matsuki H. (eds) *High Pressure Bioscience*. Subcellular Biochemistry, vol 72. (Springer, Dordrecht.) https://doi.org/10.1007/978-94-017-9918-8_21

Peixoto, Raquel S., Rosado, Phillippe M. Rosado, . Leite, Deborah C. Leite, Rosado, Alexandre S. Rosado, eand Bourne, .Daid G. .(2017). “Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience.” *Frontiers in Microbiology* 8, no. 341, pp. (Mar): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>.

Penn, Kevin, Wu, Donying, Eisen, Jonahan A. e Ward, Naomi. (2006). Characterization of Bacterial Communities Associated with Deep-Sea Corals on Gulf of Alaska Seamounts. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, no. 2, pp. 1680-1683.

Pérez, Carlos Daniel, Neves, Bárbara d. Neves, Cordeiro, Ralf T. Cordeiro, Williams, Gary C. Williams, eand Cairns, Atephen D. Cairns. (2016). “Diversity and Distribution of Octocorallia.” In *The Cnidária, Past, Present and Future*, 109 - 123.(N.p.: Springer International). 10.1007/978-3-319-31305-4_8.

Pham, Christopher K., Diogo, Hugo Diogo, Menees, Gui Menees, Porteiro, Filipe Porteiro, Braga-Henriques, Andreia Braga-Henriques, Vandeperre, Frederic Vandeperre, eand Morato, Telmo Morato. (2014). “Deep-water longline fishing has reduced impact on Vulnerable Marine Ecosystems.” *Scientific Reports* 4, no. 4837, pp. (Apr): 1-7. 10.1038/srep04837.

Pillay, B., G. Roth, eand R. A. Oellerman. (2010). “Nitrification and the enumeration of marine nitrifying bacteria in a closed prawn-culture system.” *South African Journal of Marine Science* 8, no. 1, pp. (Apr): 325-332. <https://doi.org/10.2989/02577618909504572>.

Pogoreutz, C., Voolstra, C. R., Rådecker, N., Weis, V., Cardenas, A., e& Raina, J. B. (2020). “The coral holobiont highlights the dependence of cnidarian animal hosts on their associated microbes.” In *Cellular dialogues in the holobiont* (pp. 91-118). (CRC Press).

Poli, Annarita, Finore, Ilaria Finore, Romano, Ida Romano, Gioiello, Alessia Gioiello, Lama, Licia Lama, eand Nicolaus, Barbara Nicolaus. (2017). "Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules." *Microorganisms* 5, no. 25, pp. (May): 30. 10.3390/microorganisms5020025.

Pomponi Shirley A, Diaz, M. Cristina, Van Soest, Rob W. M., Bell, Lori J., Busutil, Linnet, Gochfeld Deborah J., Kelly Michelle eand Slattery Marc. "Sponges". In: Loya, Y., Puglise, K., Bridge, T. (eds) *Mesophotic Coral Ecosystems. Coral Reefs of the World*, Vol 12. (Springer, Cham). https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_32.

Poole, Robert K., Gibson, Frank Gibson, eand Wu, Guannghui Wu. (1994). "The cydD Gene Product, Component of a Heterodimeric ABC Transporter, is Required for Assembly of Periplasmic Cytochrome c and of Cytochrome bd in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiology Letters* 177, pp. (January): 217-224. 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06768.x.

Proctor, Lita M. e Gunsalus, Robert P. (2000). "Anaerobic respiratory growth of *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* and *Photobacterium leiognathi* with trimethylamine N-oxide, nitrate and fumarate: ecological implications" *Environmental Microbiology* Vol. 2, no. 4, pp. (March):399-406. 10.1046/j.1462-2920.2000.00121.x.

Qin, Yongjun, Huang, Zongqing Huang, e and Liu, Ziduo Liu. (2013). "A Novel Cold-active and Salt-tolerant α -amylase from Marine Bacterium *Zunongwangia profunda*: molecular Cloning, Heterologous Expression and Biochemical Characterization." *Extremophiles* 18, pp. (December): 271-281. 10.1007/s00792-013-0614-9.

Ramsby, Blake D., Shirur, Kartick P., Iglesias-Prieto, Roberto eand Goulet, Tamar L. (2014). "Symbiodinium photosynthesis in caribbean octocorals". *PLoS ONE* 9, no. 9, pp. (September):1- 11. doi:10.1371/journal.pone.0106419

Rapp, Hans Tore, Janussen, Dorte e, Tendal, Ole S. (2011). "Calcareous sponges from abyssal and bathyal depths in the Weddell Sea, Antarctica". *Deep-Sea Research II* 58, pp. (June): 58-67. doi:10.1016/j.dsr2.2010.05.022.

Ribes, Marta, Diallas, Claudia, Coma, Rafel eand Riemann Lasse. (2015). "Microbial diversity and putative diaotrophy in high- and low-microbial-abundance Mediterranean sponges". *Appl Environ Microbiol* 81, pp. (June): 5683-5693. doi:10.1128/AEM.01320-15.

Robarts, R. D., eand Carr, G. M. Carr. (2009). "Bacteria, Bacterioplankton." In *Encyclopedia of Inland Waters*, 193-200. (N.p.: Academic Press). <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00124-1>.

Roberts, J. M., Wheeler, Andrew J. Wheeler, and e Freiwald, André Freiwald. (2006). "Reefs of the Deep: The Biology and Geology of Cold-Water Coral Ecosystems. " *Science* 312, pp. (Apr): 543-547. 10.1126/science.1119861.

Roberts, J. Murray eand Cairns, Stephen D. (2014). "Cold-water corals in a changing ocean." *Current Opinion in Environmental Sustainability* 7, pp. (January):118-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2014.01.004>

Rogers, Alex David. (2015). "Environmental change in the Deep Ocean." *Annual Review of Environment and Resources* Vol. 40, pp. (November):1-38. 10.1146/annurev-environ-102014-021415.

Rohwer, Forest, Seguritan, Victor Seguritan, Azam, Farooq Azam, and e Knowlton, Nancy Knowlton. (2002).. "Diversity and Distribution of Coral-associated Bacteria." *Marine Ecology Progress Series* 243, pp. (November): 1-10. 10.3354/meps243001.

Rosado, Phillipe M., Leite, Deborah C. Leite, Duarte, Gustavo A. Duarte, Chaloub, Ricardo M. Chaloub, Jospin, Guillaume Jospin, Rocha, Ulisses N. Rocha, Saraiva, João P. Saraiva, Dini-Andreote, Francisco,

Eisen, Jonahan A., Bourne, David G., Peixoto, Raquel S., et al. (2019). "Marine Probiotics: Increasing Coral Resistance to Bleaching Through Microbiome Manipulation." *The ISME Journal* 13, pp. (December): 921-936. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0323-6>.

Rosenberg, Eugene, Koren, Omry, Reshef, Leah, Efrony, Rotem e Zilber-Rosenberg, Ilana. (2007). "The role of microorganisms in coral health, disease and evolution." *Nature Reviews* 5, pp. (March): 355-362. [10.1038/nrmicro1635](https://doi.org/10.1038/nrmicro1635).

Röthig, Till, Yum, Lauren Y., Kremb, Stephan G., Roik, Anna e Voolstra, Christian R. (2017). "Microbial community composition of deep-sea corals from the Red Sea provides insight into functional adaptation to a unique environment." *Scientific Reports* Vol. 7, no. 44714, pp. 4 (March): 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep44714>.

Sanganyado, Edmond, Chingono, Kudakwashe E., Gweni, Willis, Chaukura e, Nhamo, Liu Wenhua. (2021). "Organic pollutants in deep sea: Occurrence, fate, and ecological implications." *Water Research* 117658. (Sep). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117658>.

Santoro, Erika P., Borges, Ricardo M. Borges, Espinoza, Josh L. Espinoza, Freire, Marcelo Freire, Messias, Camila S. Messias, Villela, Helena D. Villela, Pereira, Leandro M. Pereira, Vilela, Caren L. S., Rosado, João G., Cardoso, Pedro M., Rosado, Phillipe M., Assis, Juliana M., Duarte, Gustavo A. S., Perna, Gabriela, Rosado, Alexandre S., Macrae, Andrew, Dypont, Christopher L., Nelson, Karen E., Sweet, Michael J., Voolstra, Christian R. e Peixoto, Raquel S. et al. (2021). "Coral microbiome manipulation elicits metabolic and genetic restructuring to mitigate heat stress and evade mortality." *Science Advances* 7, pp. (33): 1-15. [10.1126/sciadv.abg3088](https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3088).

Sarmiento-Vizcaíno, Aida, González, Verónica, Braña, Alfredo F., Palacios, Juan J., Otero, Luis, Fernández, Jonathan, Molina, Axayacatl, Kulik, Andreas, Vázquez, Fernando, Acuña, José L., García Luis A. e Blanco, Gloria. (2016). "Pharmacological potential of phylogenetically diverse Actinobacteria isolated from deep-sea coral ecosystems of the submaine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea." *Environmental Microbiology* Vol. 73, pp. (September): 338-352. [10.1007/s00248-016-0845-2](https://doi.org/10.1007/s00248-016-0845-2).

Schloss, Patrick D. (2020). "Reintroducing mothur: 10 Years Later." *Applied and Environmental Microbiology* 86, no. 2, pp. (Jan): 1-13. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-19>.

Sieg, Jochen, Sandmeier, Chris Claudius, Lieske, Julia, Meents, Alke, Lemmen Christian, Streit, Wolfgang R. e Rarey, Matthias. (2022). "Analyzing structural features of proteins from deep-sea organisms." *Proteins* Vol. 90, pp. : 1521-1537. [10.1002/prot.26337](https://doi.org/10.1002/prot.26337).

Silveira, Ilson Carlos A., Dante C. Napolitano, eand Igor U. Farias. (2020). "Water Masses and Oceanic Circulation." In *Brazilian Deep-Sea Biodiversity*, pp. 7-36. N.p.: (Springer). https://doi.org/10.1007/978-3-030-53222-2_2.

Skropeta, Danielle. (2008). "Deep-sea natural products." *Natural Product Reports* Vol. 25, pp. (September): 1131-1166. [10.1039/b808743a](https://doi.org/10.1039/b808743a).

Slaterry Marc eand Lesser Michael P. (2012). "Mesophotic coral reefs: a global model of community structure and function". *Environmental Science*, pp. (July): 9-13.

Spalding, Mark D., eand Barbara E. Brown. (2015). "Warm-water Coral Reefs and Climate Change." *Science* 350, no. 6262, pp. (November): 769771. [10.1126/science.aad0349](https://doi.org/10.1126/science.aad0349).

Stecher, Glen, Tamura, Koicho e Kumar, Sudhir. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 37(4), pp. 1237-1239.

Steffen, Karin, Indraningrat, Anak A. G., Erngren, Ida, Haglöf, Jakob, Becking, Leontine E., Smidt, Hauke, Yashayaev, Igor, Kenchington, Ellen, Petterson, Curt, Cárdenas, Paco e Siphema, Detmer. (2022). Oceanographic setting influences the prokaryotic Community and metabolome in deep-sea sponges. *Nature*. Vol. 12:3356, pp. 1-16.

Strand, R., Whalan, S. Whalan, Webster, N. S. Webster, Kutti, T. Kutti, Fang, J. K. H. Fang, Luter, H. M. Luter, eand Bannister, R. J. Bannister. (2017). “The Response of Boreal Deep-Sea Sponge Holobiont to Acute Thermal Stress.” *Scientific Report 7*, no. 1660, pp. (May): 12. 10.1038/s41598-017-01091-x.

Sumida, Paulo Yukio G., De Leo, Fabio C. De Leo, eand Bernardino, Angelo F. Bernardino. (2020). In *Na Introduction to the Brazilian Deep-Sea Biodiversity..* N.p.: (Springer). Doi.org/10.1007/978-3-03053222-2.

Takai, Ken e Nakamura, Kentaro. (2011). “Archeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents” *Current Opinion in Microbiology* Vol. 14, pp. (May): 282-291. 10.1016/j.mib.2011.04.013.

Takami, Hideto. (1999). “Isolation and characterization of microorganisms from deep-sea mud”. In: Horikoshi, K. and Tsujii, K. (eds) *Extremophiles in Deep-Sea Environments*. (Springer, Tokyo). https://doi.org/10.1007/978-4-431-67925-7_1

Tang, Kai, Lin, Dan, Zheng, Qiang, Liu, Keshao, Yang, Yujie, Han, Yu e Jiao, Nianzhi. (2017). “Genomic , proteomic and bioinformatic analysis of two temperate phages in Roseobacter clade bacteria isolated from the deep sea waterr” *BMC Genomics* Vol. 18:485. 10.1186/s12864-017-3886-0.

Taylor, Michael W., Radax, Regina, Steger, Doris e Wagner, Michael. (2007). “Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, no. 2, pp. (June): 295-347. 10.1128/MMBR.00040-06.

Thakur, Narsinh L. E Müller, Werner E. G. (2004). Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*. Vol. 86, no. 11. pp. 1506-1512.

Thankur, Narsinh e Müller, Werner E. G. (2004). “Biotechnological potential of marine sponges.” *Current Science* 86, no. 11, pp. (June): 1506-1512.

Thomas, Torsten, Lucas Moitinho-Silva, Miguel Lurgi, Johannes R. Björk, Cole Easson, Carmen Astudillo-García, Julie B. Olson, et al. 2016. “Diversity, Structure and Convergent Evolution of the Global Sponge Microbiome.” *Nature Communications* 7, no. 11870 (June): 12. 10.1038/ncomms11870.

Thomas, Torsten, Moitinho-Silva, Lucas, Lurgi, Miguel, Bjork, Johannes, Easson, Cole, Astudillo-García, Carmen, Olson, Julie B., Erwin, Patrick M., López-Legentil, Susanna, Luter, Heidi, Chaes-Fonnegra, Andia, Costa, Rodrigo, Schupp, Peter J., Steindler, Laura, Erpenbeck, Dirk, Gilbert, Jack, Knight, Rob, Ackermann, Gail, Lope Jose Vvictor, Taylor, Michael W., Thacker, Robert W., Montoya, Jose M., Hentschel, Ute eand Webster, Nicole S. (2016). “Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome”. *Nat. Commum* 7, no. 11870, pp. (June): 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms11870>

Thompson, Fabiano, Ricardo Krüger, Ricardo, Thompson, Cristiane C. Thompson, Berlinck, Roberto G. Berlinck, Coutinho, Ricardo Coutinho, Landell, Melissa F. Landell, Pavão, Mauro, Mourão, Paulo A. S., Salles, Ana, Negri, Naiene, Lopes, ayano A.C., Freire, Vitor, Macedo, Alexandre J., Maraschin, Marcelo, Pérez, Carlos D., Pereira, Renato C., Radis-Baptista, Gandhi, Rezende, Rachel P., alenti, Wagner C., Abreu, Paulo C. e Bio TecMar Network. Pavão, et al. (2018). “Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation.” *Frontiers in Marine Science* Vol. 5, no. 236, pp. (July): 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00236>.

- Todd, Peter A. (2008). Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biol. Rev.*, 83. pp. 315-377.
- Tood, Peter A. (2008). "Morphological plasticity in scleractinian corals". *Biol. Rev.* 83, (May): 315-337. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00045.x
- Tortorella, Emiliana, Tedesco, Pietro, Esposito, Fortunato Palma, January, Grant Garrn, Fani, Renato, Jaspars, Marcel e De Pascale, Donatella. (2018). "Antibiotics from deep-sea microorganisms: current discoveries and perspectives." *Marine Drugs* 16, no. 355, pp. . (September): 1-16. <https://doi.org/10.3390/md16100355>.
- Trotter, Julie A., Pattiaratchi, Charitha, Montagna, Paolo, Taviani, Marco, Falter, James, Thresher Ron, Hosie, Andrew, Haig, David, Foglini, Frederica, Hua, Quan eand McCulloh, Malcolm T. (2019). "First ROV Exploraiton of the Perth Canyon: Canyon Setting, Faunal Observations, and Anthropogenic Impacts." *Front. Mar. Sci.* 6:173, pp. 1-24.
- Turley, C. M., Roberts, J.M. e Guinotte, J. M. (2007). "Corals in deep-water: will the unseen hand of ocean acidification destroy cold water ecosystems?" *Coral Reefs* 26, pp. (June):445-448. 10.1007/s00338-007-0247-5.
- Vacelet, Jean e Donadey, Claude. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bactéria. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 30, pp. 301-314.
- Van Soest, Rob W., Boury-Esnault, Nicole Boury-Esnault, Vacelet, Jean Vacelet, Dohrmann, Martin Dohrmann, Epenbeck, Dirk Epenbeck, De Voogd, Nicole J. De Voogd, Santodomingo, Nadiezhda Santodomingo, Vanhoorne, Bart Vanhoorne, Kelly, Michelle Kelly, eand Hooper, John N. Hooper. (2012). "Global Diversity of Sponges (Porifera)." *PLoS ONE* 7, no. 4, pp. (April): 23. 10.1371/journal.pone.0035105.
- Vicente, V. P. (1989). "Regional Commercial Sponge Extinctions in the West Indies: Are Recent Climatic Changes Responsible". *Marine Ecology*, 10(2), pp. , 179–191. doi:10.1111/j.1439-0485.1989.tb00073.x
- Vidyalakshmi, Rajagopal, eand Sridar, R. Sridar. (2007). "Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria". *Journal Of Culture Collections* 5 (1),pp. : 73-77. cc06010.
- Vilela, Caren L. S., Damasceno, Taissa L.,Thomas, Torsten e Peixoto, Raquel S. (2022). Global qualitativeand quantitative distribution of micropollutant in the deep sea. *Environmental Pollution*. Vol. 307, pp. 119414.
- Vilela, Caren. L. S., Villela, Helena. D. M., Rachid, Caio. T. C. D. C., Carmo, Flávia. L. D., Vermelho, Alane. B., e& Peixoto, Raquel. S. (2021). Exploring the Diversity and Biotechnological Potential of Cultured and Uncultured Coral-Associated Bacteria. *Microorganisms*, 9(11), pp.2235.
- Voigt, Oliver, Wulfing, Eilika, e Worheide, Gert. (2012). "Molecular phylogenetic evaluation of classification and scenarios of character evolution in calcareous sponges (Porifera, class Calcarea)". *PLoS ONE* 7, no. 3, pp. (March): 1-16. Doi:10.1371/42ornal.pone.0033417.
- Wakefield, Timothy S., Farmer, Mark A. Farmer, eand Kempf, Stephen C. Kempf. (2000). "Revised Description of the Fine Structure of in situ "Zooxanthellae" Genus Symbiodinium." *The Biological Bulletin* 199, no. 1, pp. (August): 76-84. 10.2307/1542709.
- Wang, Guangyi. (2006). "Diversity and Biotechnological Potential of the Sponge-associated Microbial Consortia." *J Ind Microbiol Biotchnol* 33, pp. (April): 545-551. 10.1007/s10295-006- 0123-2.
- Wang, Ya-Nan, Meng, Ling-Hong e Wang, Bin-Gui. (2020). "Progress in research on bioactive

- secondary metabolites from deep-sea derived microorganisms.” *Marine Drugs* 18, no. 614, pp. 1-26.. (December): 1-26. [10.3390/md18120614](https://doi.org/10.3390/md18120614)
- Warrant, Eric J., and Locket, N. A. Locket. (2004). “Vision in the Deep-Sea.” *Biological Reviews* 79, no. 3, pp. (August): 671-712. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006420>.
- Webster, N. S., Soo, R. M. Soo, Botté, E. S. Botté, Simister, R. L. Simister, Abdo, D. Abdo, and Whalan, S. Whalan. (2013). “Same, same but different: Symbiotic Bacterial Associations in GBR Sponges.” *Frontiers in Microbiology* 3, no. 444, pp. (January): 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00444>.
- Webster, N., Cobb, R. & Negri, A. (2008). “Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge”. *ISME J.* 2, pp. 830–842 . <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.42>
- Woodall, Lucy C., Sanchez-Vidal, Anna Sanchez-Vidal, Canals, Miquel Canals, Paterson, Gordon L. Paterson, Coppock, Rachel Coppock, Sleight, Victoria Sleight, Calafat, Antonio Calafat, Rogers, Alex D. Rogers, Narayanaswamy, Bhavani E. Narayanaswamy, and Thompson, Richard C. Thompson. (2014). “The Deep-Sea is a Major Sink for Microplastic Debris.” *Royal Society Open Science* 1, no. 140317, pp. (December): 8.
- Xu, Yu, Zhan, Zifeng, e Xu, Kuidong. (2020). “Morphology and phylogenetic analysis of the deep sea golden gorgonians (Cnidaria, Octocorallia, Chrysogorgiidae) in the Western Pacific Ocean, with the description of a new species”. *Zookeys* 989, pp. (November): 1-37.
- Y. Sumida. (2020). “Brazilian Deep-Sea Corals.” In *Brazilian Marine Biodiversity*, pp. 73-107. (N.p.: Springer Nature). https://doi.org/10.1007/978-3-030-53222-2_4.
- Yakimov, M. M., Cappello, S., Crisafi, E., Tursi, A., Savini, A., Corselli, C., Scarfi, S.... e& Giuliano, L. (2006). Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the Apulian plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(1), pp. 62-75.
- Yayanos, A. Aristides, Dietz, Allan S. and Boxtel, R. Van. (1981). “Obligately Barophilic Bacterium from the Mariana Trench”. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78, no. 8. pp. (August): 5212-5215. [10.1073/pnas.78.8.5212](https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.5212).
- Yazawa, Kazunaga. (1996). “Production of Eicopentaenoic Acid from Marine Bacteria.” *Lipids*. 31, no. 1. pp. (January): 5297-5300. <https://doi.org/10.1007/BF02637095>.
- Zan, Shuaijun, Wang, Jimg, Wang, Fengbo, Li, Zelong, Du, Miaomiao e Cai, Yingxue. (2022). “A novel degradation mechanism of naphthenic acids by marine *Pseudoalteromonas* sp.” *Journal of Hazardous Materials* Vol. 424, (October): 127534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127534>.
- Zhang, Jian, Sun, Qing-lei, Zeng, Zhi-gang, Chen, Shuai e Su, Li. (2015). “Microbial diversity in the deep-sea sediments of Iheya North and Iheya Ridge, Okinawa Trough. ” *Microbiological Research* Vol. 177, pp. (May): 43-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.006>.
- Zhang, Zenghu, Wu, Yanhong and Zhang, Xiao-Hua. (2017). “Cultivation microbes from the deep-sea environments.” *Deep-Sea Research Part II*. pp. (July):1-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.07.008>.

