



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA E PROSPECÇÃO DE GENES DE  
RESISTÊNCIA EM ESPONJAS DO GRANDE RECIFE AMAZÔNICO**

**ISABEL CRISTINE COSTA GARCIA**

Duque de Caxias

2023

# **CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA E PROSPECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ESPONJAS DO GRANDE RECIFE AMAZÔNICO**

ISABEL CRISTINE COSTA GARCIA

Laboratórios de pesquisa: Laboratório de Engenharia de Sistemas e Saúde e Laboratório de Microbiologia, UFRJ - COPPE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito necessário para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.  
Orientador: Dr. Diogo Antônio Tschoeke.

Duque de Caxias

2023

ISABEL CRISTINE COSTA GARCIA

**Caracterização Metagenômica E Prospecção De Genes De Resistência Em  
Esponjas Do Grande Recife Amazônico**

**Duque de Caxias, XX de XXXX de 2023**

---

**Dr. Diogo Antônio Tschoeke, Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(Orientador)**

---

**Dr. William Corrêa Tavares, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Revisor)**

---

**Dra. Ana Carolina Ferreira de Albuquerque, Universidade Federal do Rio de  
Janeiro (Banca Examinadora)**

---

**Dra. Maria Luiza Machado Campos, Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(Banca Examinadora)**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ARGs</b>	Resistência a antibióticos (Do inglês <i>Antibiotic Resistance Genes</i> )
<b>BTAs</b>	Alcaloides tirosina bromados
<b>CARD</b>	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
<b>CDC</b>	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
<b>CTAB</b>	Brometo de cetiltrimetilamônio
<b>GRAS</b>	Grande Sistema de Recifes da Amazônia (do inglês <i>Great Reefs Amazon System</i> )
<b>HMA</b>	<i>Hight Microbial Abundance</i>
<b>HTML</b>	<i>Hyper Text Markup Language</i>
<b>LMA</b>	<i>Low Microbial Abundance</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NRPS</b>	Peptídeo sintetase não ribossomal
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PKS</b>	Policetídeo sintetase
<b>RAM</b>	Genes de resistência a antibióticos (do inglês <i>antibiotic resistance genes</i> )
<b>RiPPs</b>	Ribossomos e modificados pós-tradução
<b>NRPS</b>	Peptídeo sintetase não ribossomal

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Imagem satélite SeaWiFS mostrando o alcance (pluma) do Rio Amazonas no Oceano Atlântico Norte tropical. Fonte: NASA.....1
- Figura 2:** *Aiolochoia crassa*, University of Miami & Myron Wang, March 1991, Bahamas, *Atlantic Ocean* Fonte: [https://damsl.org/catalog-number-results-page/?catalog-index-number-cin=0007&wpv\\_filter\\_submit=Submit#](https://damsl.org/catalog-number-results-page/?catalog-index-number-cin=0007&wpv_filter_submit=Submit#).....4
- Figura 3:** *Amphimedon compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864, Descr Diption Lectotype, ZMA Por. St. Thomas, Virgin Islands. Author van Soest, Rob. Fonte: <https://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=image&tid=166666&pic=41911>..... 5
- Figura 4:** Principais mecanismos de ação e de resistência dos antibióticos em bactérias (Mulvey e Simor, 2009).....11
- Figura 5:** Fluxograma de processamento dos dados obtidos a partir do sequenciamento. A etapa de amostragem e sequenciamento foi realizada por Rua (2018).....14
- Figura 6:** Local de coleta das amostras em setembro de 2014. Não havia a presença da pluma no momento da coleta.....15
- Figura 7:** Comparação taxonômica. Gráfico de pizza representando a porcentagem entre domínios presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).....22
- Figura 8:** Comparação taxonômica. Gráfico de barras representando a porcentagem entre filos bacterianos presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).....23
- Figura 9:** Comparação funcional em porcentagem dos diferentes mecanismos de resistência e toxicidade presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23). .....25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Local e data de amostragem das espécies <i>Amphimedon compressa</i> e <i>Aiolochoiria crassa</i> .....	15
<b>Tabela 2:</b> Resultados do número de sequencias obtidas após o controle de qualidade utilizando o programa Prinseq.....	21
<b>Tabela 3:</b> Resultados obtidos com a montagem dos genomas.....	22
<b>Tabela 4:</b> Abundância em porcentagem dos gêneros bacterianos identificados em <i>A. compressa</i> (FT03) e <i>A. crassa</i> (FT23).....	24
<b>Tabela 5:</b> Resultados de genes de resistência a antibióticos encontrados comparando proteínas preditas contra base de dados <i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i> (CARD) para a amostra de <i>A. compressa</i> (FT03).....	26
<b>Tabela 6:</b> Resultados de genes de resistência a antibióticos encontrados comparando proteínas preditas contra base de dados <i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i> (CARD) para a amostra de <i>A. compressa</i> (FT23).....	26
<b>Tabela 7:</b> Abundância relativa em porcentagem de famílias bacterianas possivelmente patogênicas presentes em <i>A. compressa</i> (FT03) e <i>A. crassa</i> (FT23).....	28

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Linha de comando para o programa Prinseq e legenda de parâmetros utilizados. ....	17
<b>Quadro 2:</b> Linha de comando para o programa Megahit e legenda de parâmetros utilizados. ....	18
<b>Quadro 3:</b> Linha de comando para o programa Prodigal e legenda de parâmetros utilizados.....	19
<b>Quadro 4:</b> Linha de comando para o programa Usearch e legenda de parâmetros utilizados.....	20

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha gratidão e dedico este trabalho à minha família, meu maior bem. Especialmente aos meus pais, Geysa e Ronaldo, por sempre depositarem confiança na educação e por terem fornecido, com todo amor, o suporte que puderam para o meu desenvolvimento. Sou muito grata por sempre terem acreditado nos meus sonhos ao meu lado. A vocês devo todo meu amor e conquistas.

Ao meu parceiro e amigo Henrique Corrêa, por contribuir para o meu crescimento pessoal, pelas histórias incríveis que construímos juntos e por não permitir que eu desanime na busca pelos meus objetivos.

Aos amigos que conquistei ao longo da minha jornada, que me apoiaram em diferentes momentos da vida, e àqueles que a graduação me proporcionou, tornando meus dias mais alegres e descontraídos. Em especial à Anne Raissa, que me incentivou muito e acompanhou de perto toda a trajetória até aqui, sempre torcendo pelo melhor.

Ao meu orientador, Diogo Antônio Tschoeke, por toda a paciência e ensinamentos dedicados durante os períodos tumultuados da pandemia e além, mas principalmente por acreditar no meu potencial e introduzir-me à área da bioinformática, na qual desejo seguir.

À comissão avaliadora, Dra. Ana Carolina Ferreira e Dra. Maria Luiza Machado, que prontamente aceitaram participar e contribuir com suas considerações, e que marcaram positivamente o período da graduação, cada uma à sua maneira.

Ao Dr. William Corrêa Tavares, pela sua prontidão e minuciosa revisão deste trabalho.

À dádiva da vida e à sua força criadora que me permitem estar e ser.

## RESUMO

As esponjas marinhas são organismos filtradores bentônicos e sésseis pertencentes ao filo Porifera. São seres multicelulares do reino animal que abrigam uma vasta e complexa microbiota associada de interesse biotecnológico e para a saúde pública. Neste contexto, estes holobiontes são caracterizados de acordo com a abundância e diversidade da sua microbiota, podendo ser *High Microbial Abundance* ou *Low Microbial Abundance*. Em razão de alguns destes microrganismos possuírem uma relação simbiótica obrigatória com a esponja, dificultando o cultivo em laboratório, a metagenômica surge como uma área apropriada ao estudo e caracterização do material genético de comunidades microbianas recuperadas a partir de amostras ambientais, sem que haja a necessidade de cultivo em laboratório. Este estudo tem como objetivo realizar uma análise metagenômica de duas esponjas presentes do Grande Recife Amazônico, sendo estas *Amphimedon compressa* e *Aiolochoia crassa*, para identificar genes de resistência a antimicrobianos, produção de antibióticos e microrganismos patogênicos presentes. Os resultados do presente estudo corroboram com as características taxonômicas dos microrganismos associados às esponjas, relatados em estudos prévios, além de suas classificações quanto à microbiota. Diversos genes de resistência e produção de antibióticos foram relatados, além de gêneros de bactérias patogênicas em humanos. No entanto, ainda não se pode afirmar a presença de influência antropomórfica com os dados obtidos, visto que os gêneros encontrados também desempenham papel ambiental da decomposição e os genes de resistência podem estar relacionados a mecanismos intrínsecos à evolução conjunta da comunidade microbiana nas esponjas.

## ABSTRACT

Marine sponges are sessile, benthic filter-feeding organisms belonging to the phylum Porifera. They are multicellular animals that harbor a vast and complex associated microbiota of biotechnological and public health interest. These holobionts are characterized by the abundance and diversity of their microbiota and can be classified as High Microbial Abundance (HMA) or Low Microbial Abundance (LMA). As some of these microorganisms have a symbiotic relationship with the sponge, making laboratory cultivation difficult, metagenomics has emerged as an appropriate area for studying and characterizing the genetic material of microbial communities recovered from environmental samples, without the need for laboratory cultivation. The present study aims to perform a metagenomic analysis of two sponges present in the Greater Amazon Reef, *Amphimedon compressa* and *Aiolochoia crassa*, to identify antimicrobial resistance genes, antibiotic-producing, and pathogenic microorganisms. The results of this study support the taxonomic characteristics of the microorganisms associated with sponges, as reported in previous studies, as well as their classification regarding the microbiota. Several resistance genes and antibiotic-producing genes were reported, along with genera of pathogenic bacteria in humans. However, it is not yet possible to confirm the presence of anthropogenic influence based on the obtained data, as the found genera also play an environmental role in decomposition, and the resistance genes may be related to intrinsic mechanisms in the coevolution of the microbial community within sponges.

## SUMÁRIO

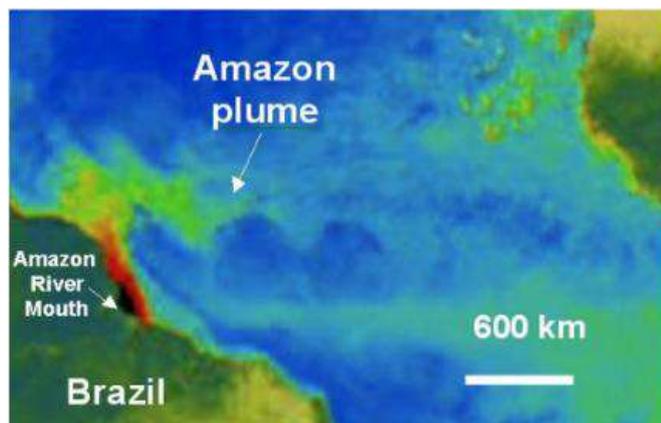
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	GRANDE RECIFE AMAZÔNICO.....	1
1.2	ESPONJAS MARINHAS E SIMBIONTES .....	2
1.2.1	Esponjas High Microbial Abundance.....	3
1.2.2	Esponjas Low Microbial Abundance.....	4
1.3	PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA SAÚDE PÚBLICA.....	5
1.4	METAGENÔMICA MARINHA.....	6
1.5	GENES PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS.....	7
1.6	GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS (ARGS).....	9
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
3.1	ETAPAS ANTERIORES A ESTA PESQUISA.....	15
3.1.1	Amostragem .....	15
3.1.2	Extração e sequenciamento do DNA Metagenômico .....	16
3.2	ANÁLISE DOS METAGENOMAS.....	16
3.2.1	Prinseq .....	16
3.2.2	Montagem dos metagenomas.....	18
3.2.3	Identificação dos genes de resistência a antibióticos (resistoma) nos metagenomas .....	19
3.2.4	Busca por similaridade e Identificação Taxonômica .....	20
4	RESULTADOS .....	21
4.1	PRÉ ANÁLISE DOS METAGENOMAS .....	21
4.2	MONTAGEM DOS GENOMAS E PREDIÇÃO GÊNICA .....	21
4.3	COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DOS METAGENOMAS .....	22
4.4	PERFIL FUNCIONAL DA MICROBIOTA.....	25
4.4.1	Genes de resistência a antimicrobianos identificados .....	25
4.4.2	Atividade de antibióticos identificados.....	27
4.5	OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	27
5	DISCUSSÃO.....	29
5.1	COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA.....	29
5.2	PERFIL FUNCIONAL .....	30
5.3	MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	33
6	CONCLUSÃO .....	35

7 PERSPECTIVAS .....	36
REFERÊNCIAS .....	367

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GRANDE RECIFE AMAZÔNICO

O Grande Sistema de Recifes da Amazônia (GRAS, do inglês *Great Reefs Amazon System*) corresponde a uma área de até 56 mil km<sup>2</sup> localizada na plataforma continental ao Norte do Brasil, no Oceano Atlântico, onde o Rio Amazonas deságua formando uma pluma (FRANCINI-FILHO *et al.*, 2018) (Figura 1). Esta pluma é caracterizada por possuir propriedades físico-químicas muito peculiares. Isso ocorre devido à magnitude do Rio Amazonas, que descarrega quase 20% da água fluvial global (COLES *et al.*, 2013). Esse grande fluxo de água favorece a deposição de altas taxas de sedimentos derivados da terra, nutrientes e matéria orgânica dissolvida (DOM, do inglês *Dissolved Organic Matter*). Além disso, impacta nos valores de pH, salinidade, temperatura, nutrientes, penetração de luz e sedimentação (MOURA *et al.*, 2016). Essas condições são favoráveis à mineralização e nutrição de esponjas marinhas e outros indivíduos presentes nesse ecossistema.



**Figura 1:** Imagem satélite SeaWiFS mostrando o alcance (pluma) do Rio Amazonas no Oceano Atlântico Norte tropical. Fonte: NASA.

De acordo com De Mahiques (2019), a partir de 2018 esta área teve sua existência questionada por empresas de petróleo e gás, políticos locais e alguns cientistas. O argumento negou a existência de grandes estruturas biológicas formadas por corais e outros organismos recifais, devido à alta taxa de sedimentação proveniente do continente. No entanto, já foi demonstrado que o bioma é povoado por extensas estruturas biogênicas e que a luz solar se faz presente no ambiente,

permitindo o desenvolvimento de organismos fotossintetizantes (DE MAHIQUES *et al.*, 2019).

Além disso, de acordo com Menezes *et al.* (2022), a pluma do rio Amazonas desempenha um papel fundamental para as esponjas marinhas que vivem em sua área de alcance. Em seu estudo, foi observada que as esponjas dependem do fluxo de águas ricas em nutrientes provenientes das plumas para sua nutrição. Além disso, foram observadas influências e similaridade entre os microrganismos presentes na pluma e aqueles que habitam o tecido do corpo da esponja como simbiontes, revelando ainda que alguns microrganismos desempenham funções dinâmicas adaptadas ao metabolismo do hospedeiro.

## 1.2 ESPONJAS MARINHAS E SIMBIONTES

As esponjas marinhas pertencem ao filo Porifera e são animais que representam um dos mais antigos organismos multicelulares, que vêm evoluindo ao longo de 580 milhões de anos. Atualmente, mais de 9000 espécies são reconhecidas e agrupadas em quatro grandes classes: Calcarea (esponjas calcáreas), Demospongiae (demosponjas), Hexactinellida (esponjas-de-vidro) e Homoscleromorpha. Além disso, em 2002 estimou-se que cerca de 14.000 espécies não identificadas se encontram distribuídas em ambiente marinho (CARRIER *et al.*, 2022; HOOPER & VAN SOEST, 2002; DE MAHIQUES *et al.*, 2019).

Estes organismos são filtradores bentônicos e sésseis que possuem papel importante no ambiente marinho que se encontram devido à sua participação nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio e fósforo (CARRIER *et al.*, 2022). Além disso, participam da reciclagem de matéria orgânica não dissolvida ao disponibilizar resíduos para níveis tróficos mais elevados através da sua alimentação por filtração, contribuindo para o funcionamento do ecossistema do recife e representando uma estratégia de conservação do mesmo (CARRIER *et al.*, 2022). Quanto à sua organização estrutural, as esponjas não apresentam tecidos verdadeiros e sua estrutura assimétrica apresenta complexidade que se assemelha a de organismos unicelulares e, dessa forma, são considerados parazoários (BRUSCA & BRUSCA, 2006).

As esponjas são conhecidas também por serem holobiontes, entidades biológicas compostas por um organismo hospedeiro e sua comunidade microbiana associada. Estes animais vivem em simbiose com microrganismos que povoam seu mesoólio. Estudos mostram que este complexo microbioma é específico para cada espécie de esponja e varia conforme o ambiente marinho (TAYLOR *et al.*, 2007). As interações ecológicas entre as esponjas e seus simbioses continuam sendo descobertas, mas diversos estudos apontam para um grande potencial de metabólitos bioativos gerados (KONSTANTINOVA *et al.*, 2020). Dentre estes, já isolados produtos naturais bioativos com atividade citotóxica para humanos, antimicrobianas e antibióticas, atividade anticancerígena e diversos outros metabólitos secundários de interesse da área da saúde (FUERST, 2014). Dessa forma, pesquisas a respeito do papel desempenhado por estes microrganismos demonstram grande relevância para a descoberta de novos compostos que possam impactar positivamente o setor de cuidados da saúde.

Sabe-se hoje que diferentes espécies de esponjas apresentam características distintas na composição e densidade de microrganismos associados. Neste sentido, pode-se diferenciar as esponjas em *Low Microbial Abundance* (LMA) e *High Microbial abundance* (HMA). Moitinho-Silva *et al.* (2017) demonstraram que algoritmos de aprendizado de máquina podem facilmente identificar os perfis de esponjas HMA e LMA com base principalmente nos perfis de filo e classe dos microrganismos associados.

### 1.2.1 Esponjas *High Microbial Abundance*

As esponjas categorizadas como HMA possuem uma alta densidade de microrganismos associados ao mesoólio. Além disso, a diversidade de microrganismos encontrados também é elevada. Em relação à densidade bacteriana, sua concentração no tecido pode corresponder a concentrações de duas a quatro ordens de grandeza a mais em relação à densidade bacteriana encontrada na água do mar (HENTSCHEL *et al.*, 2006).

Neste trabalho, realizamos a análise metagenômica da espécie HMA *Aiolochoia crassa* (HYATT, 1875) (Figura 2). Esta demosponja está distribuída da costa leste brasileira até o Golfo do México, tendo sido também reportada no Golfo de Mannar, Índia (GILES *et al.*, 2013). Pertence à família Aplysinidae e ordem Verongida (HYATT, 1875). Sabe-se que esponjas pertencentes a esta ordem são fontes de

alcaloides tirosina bromados (BTAs) provenientes do aminoácido Tirosina. (SALIB *et al.*, 2022). Estes alcaloides são bioconvertidos em compostos com atividades biológicas diversas ao longo de sua rota biossintética; dentre eles, compostos com ação citotóxica, antimicrobiana e antifúngica (SALIB *et al.*, 2022). Discute-se ainda que tais metabólitos podem ser, na verdade, provenientes de bactérias associadas, dado que Nicacio e colaboradores (2017) isolaram alcaloides derivados de bromotirosina da bactéria *Pseudovibrio denitrificans Ab134*, simbiote da esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*, da ordem Haplosclerida.



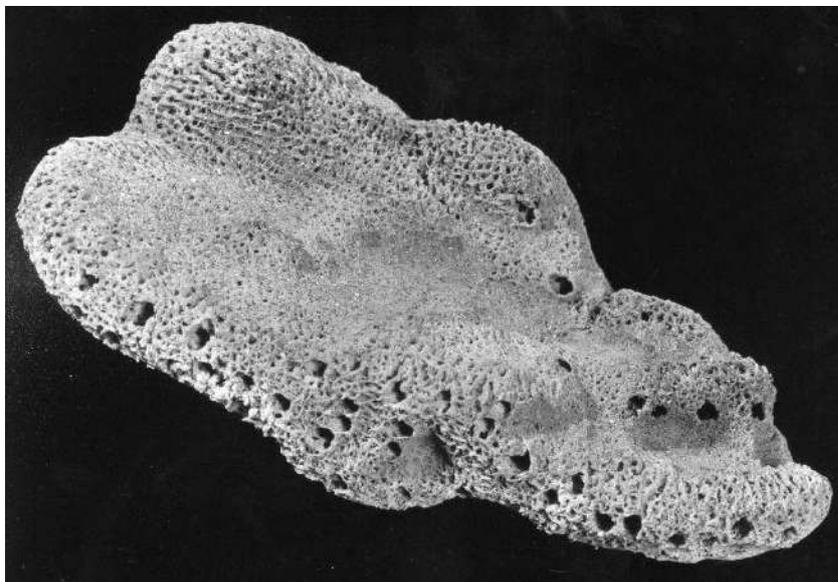
**Figura 2:** *Aiolochroia crassa*, University of Miami & Myron Wang, March 1991, Bahamas, *Atlantic Ocean* Fonte: [https://damsl.org/catalog-number-results-page/?catalog-index-number-cin=0007&wpv\\_filter\\_submit=Submit#](https://damsl.org/catalog-number-results-page/?catalog-index-number-cin=0007&wpv_filter_submit=Submit#)

### 1.2.2 Esponjas *Low Microbial Abundance*

Em oposição à característica do grupo de esponjas mencionado anteriormente, as esponjas classificadas como *Low Microbial Abundance* (LMA) possuem baixa densidade de microrganismos associados ao mesoólio. Além disso, possuem menor diversidade desses microrganismos e clados únicos podem predominar seu tecido (GILES *et al.*, 2013). Estudos sugerem ainda que o microbioma das esponjas LMA possui semelhança com a água do mar que as rodeia. Esse contraste tem sido associado à morfologia e fisiologia do hospedeiro, visto que as esponjas LMA possuem taxa de bombeamento mais altas em relação à HMA (WEISZ *et al.*, 2008).

A esponja *Amphimedon compressa* pertencente à família Niphatidae, ordem Haplosclerida e classe Demospongiae (VIEIRALVES, 2004) (Figura 3) foi analisada neste trabalho como representante do grupo LMA. Esta espécie foi relatada principalmente no Caribe oriental, habitando também áreas do Golfo do México, Mar

das Caraíbas e Plataforma Continental do Nordeste brasileiro (DE VOOGD, 2023). A atividade antimicrobiana de amplo espectro foi relatada anteriormente por Thompson et. al (2013) em uma *Amphimedon compressa* extraída da costa jamaicana.



**Figura 3:** *Amphimedon compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864, Descr Diption Lectotype, ZMA Por. St. Thomas, Virgin Islands. Author van Soest, Rob. Fonte: <https://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=image&tid=166666&pic=41911>

### 1.3 PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA SAÚDE PÚBLICA

A resistência antimicrobiana (RAM) por parte das bactérias consiste em um fenômeno natural que ocorre por mecanismo de mutação espontânea, transferência horizontal ou recombinação gênica que pode ocorrer por meio de processos de transformação, conjugação e transdução (SNUSTAD *et al.*, 2016). Esses mecanismos permitem que as bactérias evoluam rapidamente, sendo cruciais para sua sobrevivência e adaptação às mudanças ambientais. No entanto, o uso irresponsável de antimicrobianos atrelado a práticas irresponsáveis e abusivas ocasionou impactos negativos na saúde, realizando uma pressão seletiva que culminou no surgimento de bactérias com mecanismos de resistência a diversos medicamentos desta classe, se tornando assim uma problemática para a saúde pública e gerando uma alerta para uma crise global (MURRAY *et al.*, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a RAM como uma das dez principais ameaças à saúde pública global contra a humanidade (WHO, 2020). O

Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos relatou que, anualmente, existem mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antimicrobianos nos EUA, resultando em quase 223.900 mortes (CDC, 2019). Microrganismos resistentes a antimicrobianos foram identificados em todo o mundo, tornando a resistência uma crise global (CDC, 2019). Esta resistência antimicrobiana põe em risco muitas conquistas médicas modernas, como transplante de órgãos, quimioterapia e cirurgias, pois esses procedimentos podem se tornar extremamente perigosos na ausência de antimicrobianos eficazes (CDC, 2019; WHO, 2020).

Sua causa e disseminação ocorre devido a uma série de atividades humanas, incluindo o uso excessivo e indevido de antibióticos em humanos, erros na prescrição (na escolha do fármaco, na dosagem ou no tempo de uso) e a automedicação, que tem contribuído para a seleção de microrganismos resistentes (WHO, 2020). O uso de antibióticos na pecuária, agricultura e na criação de peixes comerciais e frutos-do-mar também contribui significativamente para o desenvolvimento da resistência a antibióticos, pois pode levar à seleção e disseminação de bactérias resistentes no ambiente (CDC, 2019; MAPA, 2009; ANVISA, 2017).

As consequências da RAM podem ser graves, como aumento da morbidade em humanos, mortalidade e custos de saúde. De acordo com O'Neill *et al.* (2016), estima-se que até 2050, a RAM poderá causar mais de 10 milhões de mortes por ano, ultrapassando doenças graves como o câncer, e custar à economia global até US\$ 100 trilhões. Além dos impactos diretos na saúde, a RAM também tem implicações significativas para a segurança alimentar, desenvolvimento econômico e segurança nacional.

#### 1.4 METAGENÔMICA MARINHA

O conceito de metagenômica, isto é, para além dos genomas, está relacionado a uma estratégia não dependente de cultivo, fundamentada na análise de sequências de DNA de uma mistura de comunidades microbianas. Dessa forma, trata-se de uma abordagem genômica que envolve a totalidade do material genético extraído diretamente de amostras provenientes do meio ambiente. (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Desta forma, é possível avaliar a diversidade genética presente em uma amostra, compreender quais microrganismos se encontram e quantificá-los, realizar buscas por similaridade, a fim de encontrar genes de interesse, conhecer ao nível

metabólico os microrganismos presentes, suas interações, dentre outras vastas possibilidades. (HANDELSMAN, 2004; NAZIR, 2016)

Outro estudo que pode ser desenvolvido através desta abordagem refere-se a busca por genes de resistência a antibióticos (ARGs - *Antibiotic Resistance Genes*) nas amostras. Esta abordagem se apresenta como uma grande ferramenta para que a problemática da resistência aos antimicrobianos possa ser monitorada internacionalmente, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias (Komolafe, 2003). Outra possibilidade consiste na descoberta de novos compostos e atividades antimicrobianas, abrindo portas para novos tratamentos no combate a doenças infecciosas cujo medicamento hoje estão se tornando ineficazes, como a pneumonia, tuberculose, gonorreia e infecções transmitidas por alimentos (WHO, 2020).

A abordagem da metagenômica na biologia vem desempenhando um importante papel no campo científico, pois possibilita o estudo de espécies simbiotes não cultiváveis em laboratório. Dessa forma, a aplicação da genômica e metagenômica ao estudo da biodiversidade, saúde e sustentabilidade pode ajudar a compreender estes campos e sugerir novas abordagens que levam a melhores resultados na saúde pública, compreensão e prospecção ambiental (FUERST, 2014).

## 1.5 GENES PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos podem ser definidos como “qualquer substância que, em baixa concentração, exerce toxicidade seletiva contra microrganismos” (Instrução Normativa Nº 26, de 9 De Julho De 2009, Ministério Da Agricultura) cuja natureza pode ser natural (antibióticos) ou sintética (quimioterápicos) (MOTA *et al.*, 2010).

Os antibióticos por sua vez, podem ser definidos como substâncias químicas produzidas por microrganismos (fungos, bactérias), capazes de exercer ação seletiva e tóxica contra bactérias. (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 26, DE 9 DE JULHO DE 2009) Estes são sintetizados por meio do metabolismo secundário, ou seja, sem o envolvimento direto dos ribossomos (PELAEZ, 2006). Cada antibiótico é caracterizado por uma ação específica, podendo variar muito em suas propriedades físicas e químicas e em sua toxicidade para os animais. Os antibióticos, portanto, pertencem à classe dos antimicrobianos e em síntese, são “substância química produzida ou derivada de microrganismos que, em baixa concentração, inviabiliza ou inibe o

crescimento de microrganismos causadores de doenças” (Instrução Normativa Nº 26, de 9 De Julho De 2009, Ministério Da Agricultura).

As moléculas antimicrobianas podem ser substâncias naturais ou sintéticas. Independentemente da origem dos compostos, seu objetivo principal é ser capaz de interromper vias essenciais para o funcionamento de um ou mais microrganismos. A maioria dos antibióticos disponíveis atualmente no mercado é direcionada para alvos genéticos importantes para a fisiologia das bactérias em ambientes ricos em nutrientes, supondo-se que sejam igualmente importantes em condições semelhantes às do hospedeiro. (NEWMAN *et al.*, 2003)

Os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação. Dentre eles, podemos citar: I) Inibidores de síntese de proteína. II) Inibidores de atividade metabólica: III) Inibidores da membrana celular. IV) Inibidores da parede celular. V) Inibidores da síntese de DNA (ABUSHAHEEN, 2020).

Os antibióticos podem exercer ação: I) Bacteriostática, quando são responsáveis por manter o crescimento bacteriano em fase estacionária por meio de ligação relativamente fraca com a célula, atuando comumente através da inibição de algum processo bioquímico; II) Bactericida, quando são responsáveis por provocar a morte das bactérias ligando-se fortemente ao seu alvo celular (MADIGAN *et al.*, 2016). Com base em suas estruturas químicas e modos de ação, é possível dividir os antibióticos comuns em 16 famílias. Entre as principais estruturas de antibióticos estão os  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrolídeos, trimetoprim e glicopeptídeos (STOLL *et al.*, 2012).

Os antibióticos são sintetizados a partir de vias enzimáticas complexas codificadas em clusters de genes, os quais normalmente incluem pelo menos um gene de resistência para o antibiótico correspondente. De acordo com Mak *et al.* (2014) em diversas situações, a ativação dos genes de resistência está fortemente associada à produção de antibióticos, visto que bactérias produtoras de antibióticos codificam genes de resistência a antibióticos que as protegem das moléculas biologicamente ativas que elas produzem. Estudos apontam ainda que a produção de metabólitos secundários microbianos está intimamente relacionada com as condições de crescimento, visto que a análise genética para algumas espécies de bactérias revelou a presença de mais de 20 aglomerados de genes responsáveis pela síntese de

policetídeos ou peptídeos não ribossomais, sendo este número superior ao de compostos isolados em laboratório (PELAEZ, 2006).

Os peptídeos não ribossomais e policetídeos são dois tipos importantes de antibióticos que apresentam grande variedade estrutural e funcional. Eles são produzidos por enzimas multifuncionais chamadas de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e policetídeo sintetase (PKS), respectivamente (NAYFACH *et al.*, 2021). As enzimas NRPS e PKS possuem uma estrutura modular semelhante em seus domínios catalíticos e utilizam um mecanismo de montagem linear para a produção dos compostos (O'NEILL, *et al.*, 2019). Os NRPS são frequentemente encontrados em clusters de genes que codificam grandes complexos enzimáticos multifuncionais, principalmente em espécies bacterianas ou fúngicas, e possuem atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (NAYFACH *et al.*, 2021). Já as PKS são enzimas multifuncionais que desempenham um papel importante na biossíntese de uma ampla variedade de compostos, incluindo antibióticos, antiparasitários, agentes redutores de colesterol, imunossuppressores e quimioterápicos para o tratamento do câncer (NIVINA *et al.*, 2019).

As bactérias são ainda responsáveis pela biossíntese de bacteriocinas. Estas são peptídeos antimicrobianos cíclicos ou lineares encontrados em bactérias, fungos, archaea e plantas, sendo sintetizados por ribossomos e modificados pós-tradução (RiPPs), portanto, não são considerados antibióticos. (NAYFACH *et al.*, 2021). De acordo com (ZHONG *et al.*, 2020), as bacteriocinas podem apresentar atividade bacteriostática ou bactericida contra um espectro restrito de microrganismos, com mecanismos de ação variados, tais como a inibição da biossíntese da parede celular e a inibição da expressão gênica e proteica, sendo o alvo o peptideoglicano.

## 1.6 GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS (ARGS)

O uso excessivo de antibióticos por atividades antropogênicas nas últimas décadas resultou no surgimento e expansão de organismos portadores de múltiplos genes de resistência a antibióticos (ARGs – do inglês “*antibiotic resistance genes*”) (DAS *et al.*, 2020). Neste contexto, identificar, catalogar e analisar a diversidade de microrganismos continua a ser um desafio, sendo que a metagenômica aparece como método capaz de contribuir para o estudo da taxonomia, fisiologia e genética de microrganismos ainda não cultiváveis, apresentando-se como alternativa para a

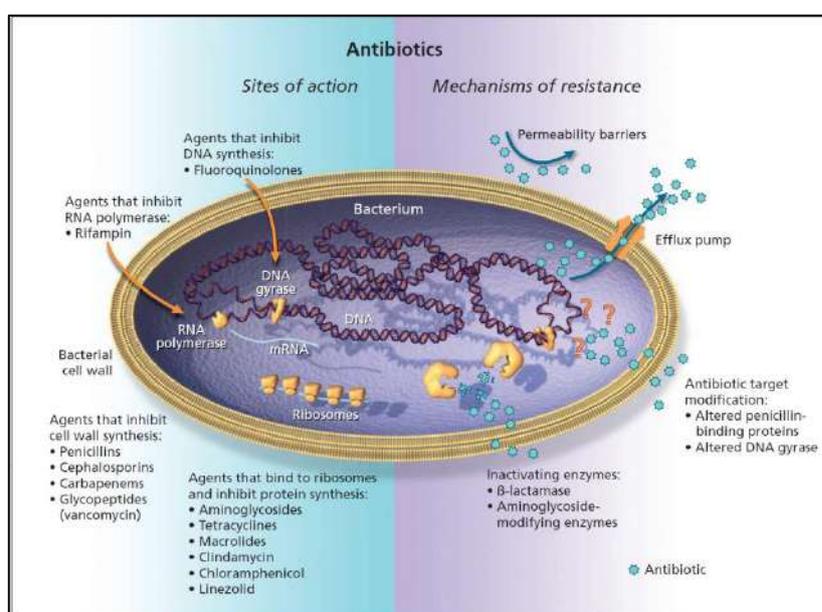
descoberta de novas enzimas e novos antibióticos como a Teiobactina (LING *et al.*, 2015).

Embora a resistência aos antibióticos seja um fenômeno natural e antigo, os impactos antropogênicos impulsionam e contribuem para a evolução, diversidade e mobilidade dos ARGs em vários ambientes, pois os ecossistemas sofrem com esta perturbação. Assim, o desenvolvimento da metagenômica superou as desvantagens das abordagens tradicionalmente dependentes de cultura e baseadas em amplificação e forneceu insights abrangentes sobre os perfis de ARGs em comunidades microbianas complexas, onde estudos metagenômicos sobre resistência a antibióticos em ecossistemas fluviais revelaram grande diversidade e abundância de ARGs (GUAN *et al.*, 2022). O conjunto de dados de sequências metagenômicas ambientais está em expansão e oferece a possibilidade de uma melhor compreensão da resistência aos antibióticos em escala global, sugerindo que o ambiente constitui um vasto reservatório de resistência e produção de antibióticos e que genes adquiridos por patógenos humanos pode ter origem ambiental (MONIER *et al.*, 2011).

Para demonstrar o espalhamento dos ARGs, Hu *et al.* (2013) analisaram o microbioma humano de 162 pacientes e encontrou 1.093 genes de resistência a antibióticos, incluindo uma grande quantidade de genes de resistência a tetraciclina. Fróes *et al.* (2016) mostraram a presença de genes de resistência a antibióticos (Beta-lactamases) em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro, demonstrando a importância deste tipo de estudo e de conhecer/monitorar a biodiversidade desses genes no ambiente. Isto se aplicado especialmente no Brasil, pois a produção de beta-lactamases, principalmente carbapenemases, é o principal desafio enfrentado pelos médicos, uma vez que os beta-lactâmicos têm sido amplamente utilizados como primeira linha no tratamento de infecções graves (CARVALHO *et al.*, 2022).

O estudo de Carvalho *et al.* (2022) identificou as comunidades bacteriana e ARGs simultaneamente em cinco regiões brasileiras e detectou 405 ARGs. As enzimas modificadoras de antibióticos foram as mais frequentes, seguidas por genes relacionados à alteração de alvos e sistemas de efluxo. Além disso, pela primeira vez no Brasil detectaram-se codificadores de carbapenemases como blaAIM-1, blaCAM-1, blaGIM-2 e blaHMB-1 em fezes de gado pela primeira vez na América do Sul. Este

gene codifica uma carbapenemase classe B, descrito pela primeira vez em 2012 a partir de três isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados na Austrália e posteriormente relatado apenas em *K. pneumoniae*, recuperado em 2019 de um paciente chinês com diarreia. Além disso, outros genes codificadores de carbapenemases (*blaCAM-1*, *blaGIM-2* e *-blaHMB-1*), descritos anteriormente apenas no Canadá e na Alemanha, também foram detectados neste estudo. Estes resultados apoiam a importância da metagenômica como ferramenta para rastrear a localização de bactérias resistentes a antimicrobianos. Sendo que os principais mecanismos pelos quais microrganismos se tornam resistentes aos antibióticos são: (I) produção de enzimas que metabolizam o antibiótico; (II) bombas de efluxo que eliminam o fármaco da célula; (III) modificações no alvo celular do antibiótico que impedem a ligação; (IV) ativação de uma via alternativa que contorna a ação da droga, e; (V) regulação negativa ou eliminação de porinas transmembranares através das quais as drogas entram na célula (Figura 4) (Liu & Pop, 2009).



**Figura 4:** Principais mecanismos de ação e de resistência dos antibióticos em bactérias (Mulvey e Simor, 2009).

Os métodos de identificação de ARG baseados em sequência podem ser divididos em: (I) baseados em montagem e (II) baseados em leitura. Nos métodos baseados em montagem, as leituras são montadas em *contigs* usando programas de montagem e, em seguida, esses *contigs* são alinhados a bancos de dados de ARG

de referência ou modelos ocultos de Markov (HMM). O método baseado em leitura, por outro lado, mapeia diretamente as leituras em bancos de dados de ARG de referência. Embora estes métodos possam identificar com sucesso ARGs conhecidos nos bancos de dados de referência, eles não podem identificar ou classificar ARGs que são altamente diferentes daqueles nos bancos de dados (WANG *et al.*, 2021).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

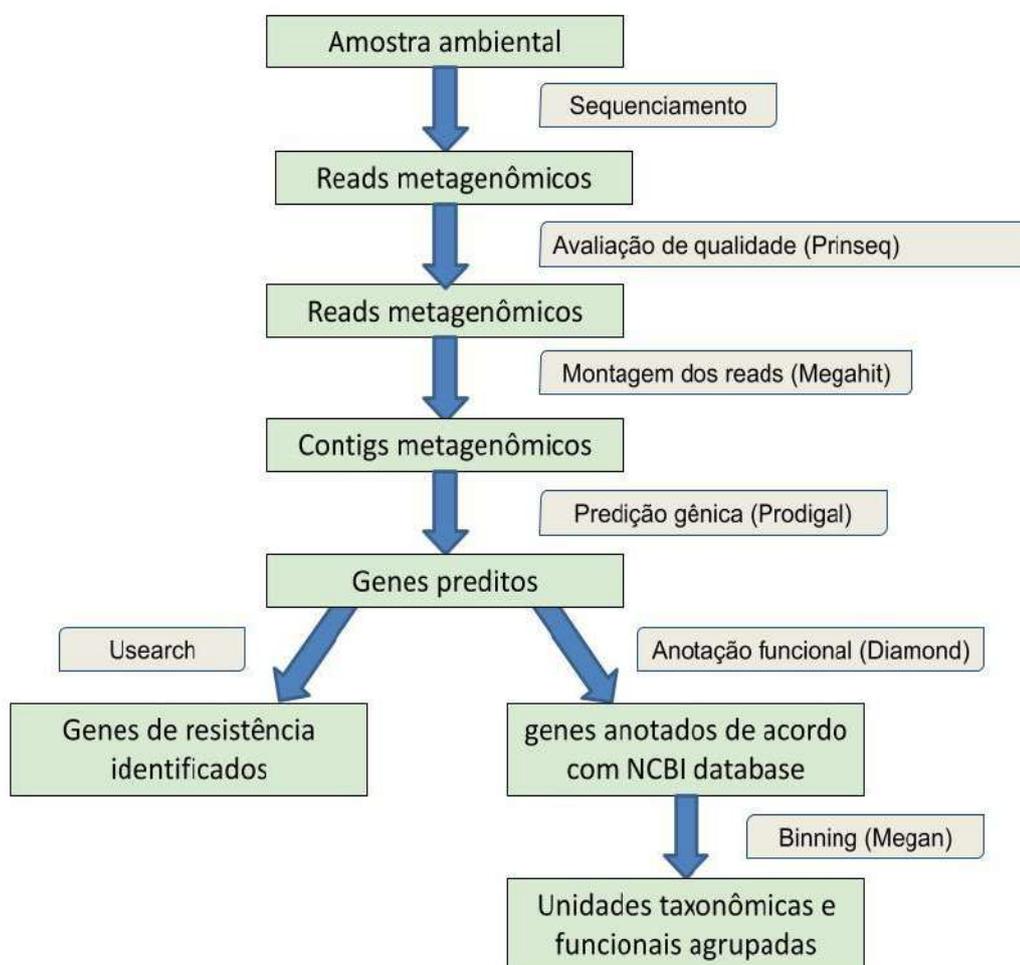
Caracterizar a microbiota e identificar de genes de resistência a antimicrobianos, produção de antibióticos e microrganismos patogênicos nas esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Aiolochoia crassa*, provenientes do Grande Sistema de Recifes da Amazônia através da abordagem metagenômica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a microbiota presente em ambas as esponjas
- Identificar genes de resistência a antimicrobianos.
- Realizar busca por mecanismos de ação dos antibióticos.
- Identificar microrganismos patogênicos, desenvolvendo estudos voltados ao entendimento da biodiversidade da microbiota em casos clínicos e no ambiente.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A análise de dados metagenômicos requer a extração e sequenciamento do material genético, além do suporte computacional de alto desempenho para associar funções a cada sequência (DINSDALE *et al.*, 2013). O fluxo de atividades na pesquisa metagenômica é dividido em diversas etapas de processamento dos dados e varia conforme o objetivo da pesquisa. Essas etapas incluem a amostragem, sequenciamento, montagem das sequências, predição dos genes, anotação funcional e classificação taxonômica, todas desempenhando um papel importante na compreensão das comunidades microbianas e de suas funções. O fluxograma realizado neste trabalho pode ser observado na figura 5.



**Figura 5:** Fluxograma de processamento dos dados obtidos a partir do sequenciamento. A etapa de amostragem e sequenciamento foi realizada por Rua (2018).

### 3.1 ETAPAS ANTERIORES A ESTA PESQUISA

#### 3.1.1 Amostragem

As amostras de ambas as esponjas deste trabalho foram coletadas em setembro de 2014 a bordo do navio hidroceanográfico NHo Cruzeiro do Sul no sistema de recifes da plataforma continental amazônica. A esponja *Amphimedon compressa*, cuja amostra neste trabalho é representada pelo código FT03, foi coletada do setor sul e a esponja *Aiolochoiria crassa*, cuja amostra é aqui representada pelo código FT23, foi coletada no setor central (Figura 6). Na época em questão a pluma do rio encontrava-se ausente na região. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até a realização da extração do DNA.



**Figura 6:** Local de coleta das amostras em setembro de 2014. Não havia a presença da pluma no momento da coleta.

**Tabela 1:** Local e data de amostragem das espécies *Amphimedon compressa* e *Aiolochoiria crassa*.

Espécie	Local de amostragem	Data de amostragem
<i>Amphimedon compressa</i>	00° 14.742S, 044° 54.089W (Sul)	29/09/2014

<i>Aiolochoiria crassa</i>	1°17.989N, 46°46.732W (Central)	27/09/2014
----------------------------	------------------------------------	------------

### 3.1.2 Extração e sequenciamento do DNA Metagenômico

A extração metagenômica e o sequenciamento do DNA foi realizado previamente (Rua *et al.*, 2018). Para a extração do DNA de tecido esponjoso, este foi macerado com almofariz e pilão estéril em nitrogênio líquido. Em seguida, o DNA foi extraído utilizando um protocolo modificado que envolveu a adição de 1 ml de brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) e tampão de lise, seguidos de três ciclos de congelamento e descongelamento com duração de 3 minutos cada.

As amostras foram lavadas em fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para desproteinização e purificadas usando o kit comercial PowerSoil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, (EUA)). A quantificação e a análise de qualidade do DNA foram realizadas utilizando Nanodrop e Qubit, e a integridade do DNA foi avaliada por meio de gel de agarose a 1%.

A preparação das bibliotecas de DNA foi realizada através do Kit de preparação de amostras de DNA Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA). A distribuição de tamanho das bibliotecas foi avaliada por meio do Bioanalyzer 2100 e do kit de DNA de alta sensibilidade (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

A quantificação das bibliotecas foi realizada usando o 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA). Para o sequenciamento pareado, foi utilizado o HiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA), com sequenciamento de 2 x 150 pb.

## 3.2 ANÁLISE DOS METAGENOMAS

### 3.2.1 Prinseq

O início do fluxo de trabalho realizado no presente estudo dá-se com o pré-processamento das sequências para avaliação da qualidade dos dados obtidos, através do software PRINSEQ (SCHMIEDER & EDWARDS, 2011). Este programa é responsável por analisar diversos aspectos dos dados sequenciados, incluindo a qualidade das bases, o número de *reads* gerados e seus tamanhos, a porcentagem

de conteúdo GC das amostras e a presença de bases ambíguas, retornando os dados considerados adequados para a análise da sequência. Foram removidas sequências menores do que 30 pares de bases (bp) e com qualidade Phred menor que 30. O restante dos parâmetros utilizados está descrito no quadro 1.

**Quadro 1:** Linha de comando para o programa Prinseq e legenda de parâmetros utilizados.

```
perl prinseq-lite.pl -fastq FT03_R1.fastq -fastq2 FT03_R2.fastq -out_format 3 -derep 1
-exact_only -trim_qual_right 20 -trim_qual_left 20 -trim_qual_type min -
trim_qual_rule lt -trim_qual_window 1 -trim_qual_step 1 -seq_case upper -seq_id
FT03_ -log FT03_ -min_len 35 - max_len 150 -min_qual_mean 30 -ns_max_p 0 -
noniupac
```

Legenda dos parâmetros:

**-fastq** <string> Arquivo de entrada no formato FASTQ contendo a sequência e dados de qualidade.

**-fastq2** <string> parâmetro utilizado para dados de extremidade emparelhada. Arquivo de entrada no formato FASTQ contendo a sequência e dados de qualidade. Os identificadores de sequência para duas sequências emparelhadas correspondentes em arquivos separados devem ter exatamente o mesmo identificador em ambos os arquivos de entrada. Neste caso, foi utilizado `_R1` e `_R2`.

**-out\_format** <string> Formato do arquivo de saída, sendo o parâmetro 3 FASTQ.

**-derep** <int> Tipo de duplicatas a filtrar. Os valores permitidos são 1, 2, 3, 4 e 5. Sendo 1 (duplicata exata), 2 (duplicata 5'), 3 (duplicata 3'), 4 (duplicata exata do complemento reverso), 5 (duplicata 5'/3' do complemento reverso).

**-trim\_qual\_right** <int> Corte da sequência por pontuação de qualidade a partir do final de 3' com esta pontuação de limite.

**-trim\_qual\_left** <int> Corte da sequência por pontuação de qualidade a partir do final de 5' com esta pontuação limite.

**-trim\_qual\_type** <min,mean,max,sum> Tipo de cálculo do índice de qualidade a ser usado.

**-trim\_qual\_rule** <lt,gt,et> Regra a ser usada para comparar o índice de qualidade com o valor calculado. As opções permitidas são lt (menor que), gt (maior que) e et (igual a).

**-trim\_qual\_window** <int> O tamanho da janela deslizante usado para calcular o índice de qualidade por tipo. Para parar na primeira base que falha na regra definida, use um tamanho de janela de 1.

**-trim\_qual\_step** <int> Tamanho do passo usado para mover a janela deslizante. Para mover a janela sobre todas as pontuações de qualidade sem perder nenhuma, o tamanho da etapa deve ser menor ou igual ao tamanho da janela.

**-seq\_case** <upper,lower> Altera a caixa de caracteres da sequência para maiúsculas ou minúsculas.

**-seq\_id** <string> Renomeie o identificador de sequência. Um contador é adicionado a cada identificador para garantir sua exclusividade.

**-log** <string> Arquivo de log para acompanhar parâmetros, erros, etc. O nome do arquivo de log é opcional. Se nenhum nome de arquivo for fornecido, o nome do arquivo de log será "inputname.log". Se o arquivo de log já existir, um novo conteúdo será adicionado ao arquivo.

**-min\_len** <int> Filtragem de sequência menores que min\_len.

**-max\_len** <int> Filtragem de sequências maiores que max\_len.

**-min\_qual\_mean** <int> Filtragem de sequências com índice de qualidade médio abaixo de min\_qual\_mean.

**-ns\_max\_p** <int> Filtragem de sequência com mais de NS maior que ns\_max\_p.

**-noniupac** Filtragem de sequências com caracteres diferentes de A, C, G, T ou N.

### 3.2.2 Montagem dos metagenomas

Para a montagem dos dados metagenômicos, foi utilizado o programa MEGAHIT (versão 1.2.9) (LI *et al.*, 2015), utilizando os parâmetros padrão. Este passo é responsável por gerar sequências de maior tamanho a partir dos *reads*, denominados "*contigs*". As linhas de comando estão descritas no quadro 2:

**Quadro 2:** Linha de comando para o programa Megahit e legenda de parâmetros utilizados.

```
megahit -1 leituras_boas_frame1.fastq -2 leituras_boas_frame2.fastq --12 leituras-boas_singletons.fastq -o diretório_de_saída --k_min 21 --k_max 141 --k_step 10 --num_cpu_threads 30 -m 265.0
```

**-1** <pe1> Arquivo de entrada no formato fastq contendo reads pareados com reads contidos em <pe2>

**-2** <pe2> Arquivo de entrada no formato fastq contendo reads pareados com reads contidos em <pe1>

**--12** <pe12> Arquivo de entrada no formato fastq contendo reads não pareados.

**-m/--memory** <float> Memória máxima em bytes a ser usada na montagem.

**--k-min** <int> Tamanho mínimo de kmer (<= 255).

**--k-max** <int> Tamanho máximo de kmer (<= 255).

**--k-step** <int> Incremento do tamanho do kmer de cada iteração (<= 28)

**--num-cpu-threads** <int> número de threads da CPU.

**-o/--out-dir** <string> Diretório de saída dos dados.

Em seguida, a predição dos genes das sequências foi realizada utilizando o Software Prodigal (Versão 2.6.3) (HYATT *et al.*, 2010). Este software examina a sequência montadas em busca de sinais de codificação e usa seu modelo para determinar a presença e a localização dos genes. Ele gera uma lista de possíveis genes preditos, incluindo informações sobre sua posição (coordenadas) e direção da (HYATT *et al.*, 2010) (Quadro 3).

**Quadro 3:** Linha de comando para o programa Prodigal e legenda de parâmetros utilizados.

**prodigal -i** Contigs.fasta **-a** proteinas\_preditas.fasta **-d** genes\_preditos.fasta **-o** posicoes\_de\_predicao.gbk **-p** meta

**-i** Arquivo de entrada no formato FASTA, contendo os contigs, gerados pelo MEGAHIT

**-a** Arquivo de saída contendo as proteínas preditas

**-d** Arquivo de saída contendo os genes preditos

**-o** Arquivo contendo as especificações do resultado gerado

**-p** Especificação do procedimento gerado, sendo o parâmetro meta utilizado para análise de dados metagenômicos.

### 3.2.3 Identificação dos genes de resistência a antibióticos (resistoma) nos metagenomas

Com o objetivo de identificar genes relacionados à resistência, os arquivos com extensão fasta contendo as proteínas preditas foram processados contra base de dados de genes de resistência a antibióticos “*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*” (CARD) através do programa USEARCH (versão 11) (EDGAR *et al.*, 2015), utilizando os parâmetros descritos no quadro 4. Os resultados foram obtidos considerando uma identidade superior a 70% (KIM *et al.*, 2018; KOONIN, 2005).

**Quadro 4:** Linha de comando para o programa Usearch e legenda de parâmetros utilizados.

```
usearch -usearch_global <proteínas preditas.fasta> -db <base_de_dados_card.fasta> -id 0.7 -blast6out <arquivo_saida.tsv>
```

**-usearch\_global** Caminho e nome do arquivo FASTA contendo os genes preditos.

**-db** Caminho e nome do arquivo FASTA da base de dados CARD.

**-id 0.7** define uma identidade mínima de 70% para considerar uma sequência correspondente.

**-blast6out** Caminho e nome do arquivo de saída no formato de arquivo de texto separado por tabulações com um alinhamento por linha.

### 3.2.4 Busca por similaridade e Identificação Taxonômica

A busca de similaridade por genes de potencial biotecnológico e de resistência a antimicrobianos foi realizada com o programa DIAMOND (BUCHFINK *et al.*, 2021) utilizando bases de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI). O *Binning* das sequências a partir do resultado do DIAMOND foi realizado com o Software MEGAN Community Edition (Version 6.21.14, built 15 Oct 2021) (HUSON *et al.*, 2016), contra anotações do banco de dados de proteínas do NCBI, utilizando parâmetros padrão. O *Binning* é o passo responsável pelo mapeamento das classes taxonômicas e funcionais a partir do passo anterior, objetivando um levantamento de quais microrganismos estão presentes nas amostras. Sendo que a partir desta identificação é possível identificar organismos patogênicos, ou potencialmente patogênicos, para a saúde coletiva com base na literatura.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PRÉ ANÁLISE DOS METAGENOMAS

De um total de 23.123.812 sequências pareadas geradas pelo sequenciamento do DNA metagenômico, 10.252.945 sequências passaram pelo controle de qualidade do Prinseq para a amostra *A. compressa*, considerando sequências pareadas e não pareadas. Para a amostra de *A. crassa*, 26.201.264 sequências pareadas foram geradas pelo sequenciamento. Dessas, um total de 11.453.407 sequências passaram pelo controle de qualidade do Prinseq (Tabela 2).

**Tabela 2:** Resultados do número de sequências obtidas após o controle de qualidade utilizando o programa Prinseq.

Dados após o controle de qualidade	<i>A. compressa</i>	<i>A. crassa</i>
Número de sequências pareadas	6.086.688	6.450.957
Sequências não pareadas R1	3.964.543 (34.29%)	4.790.998 (36.57%)
Sequências não pareadas R2	201.714 (1.74%)	211.452 (1.61%)
Tamanho médio das sequências (pb)	294.56	291.56

### 4.2 MONTAGEM DOS GENOMAS E PREDIÇÃO GÊNICA

Como resultado da montagem de genomas, o programa Megahit recuperou a partir da esponja *A. compressa* um total de 308.432 *contigs*, representando 258.717.559 bp. O tamanho mínimo de *contig* gerado dessa esponja foi de 200pb e o maior *contig* recuperado possui tamanho de 40.288 pb. Para a esponja *A. crassa*, 498.831 *contigs* foram montados, representando 272.367.888 bp de comprimento. Destes *contigs*, o de menor comprimento possui também 200pb e o de maior comprimento 36.211 bp (Tabela 3).

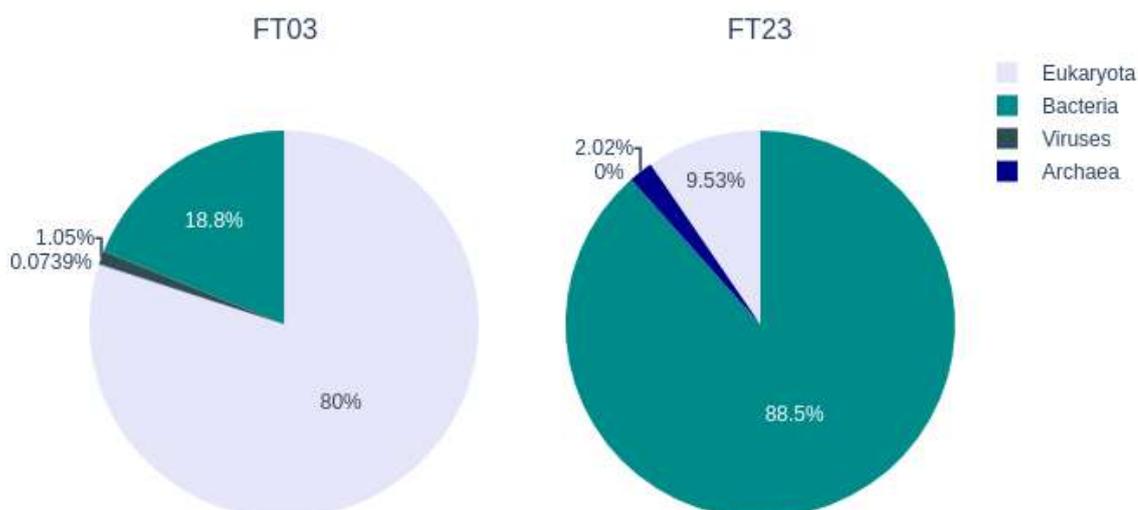
O software Prodigal identificou 308.432 genes para a amostra de *A. compressa* e 498.831 para a amostra de *A. crassa*.

**Tabela 3:** Resultados obtidos com a montagem dos genomas.

Resultado	<i>A. compressa</i>	<i>A. crassa</i>
N contigs	308.432	498.831
N pb	258.717.559 bp	272.367.888 bp
Comprimento mínimo	200 bp	200 bp
Comprimento máximo	40.288 bp	36.211 bp

### 4.3 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DOS METAGENOMAS

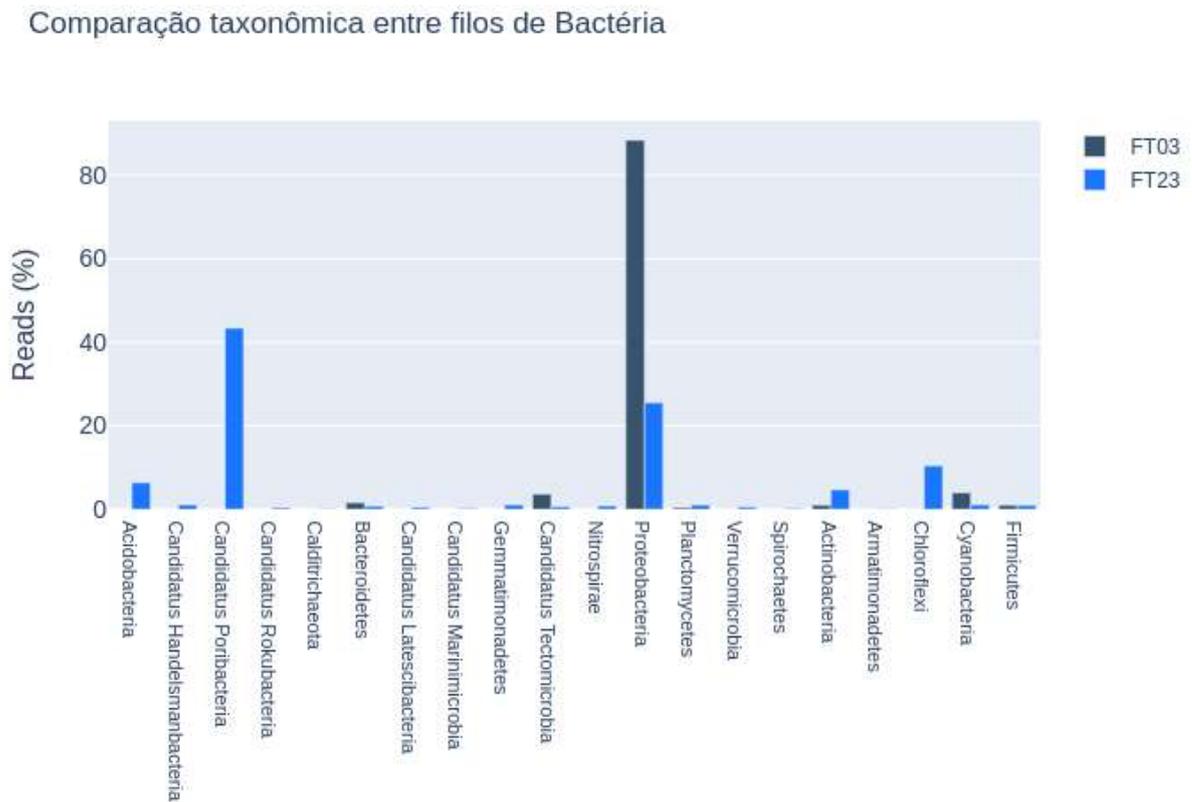
Comparação taxonômica entre domínios



**Figura 7:** Comparação taxonômica. Gráfico de pizza representando a porcentagem entre domínios presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).

Para a amostra de *A. compressa* coletada, o domínio mais abundante encontrado foi Bactéria, com 71.818 reads, seguido de Eukarya com 7.733 e Arquea,

com 1.638 reads. Nesta amostra, não foi encontrada a presença do domínio Virus. Para a esponja *A. compressa*, foi observada maior abundância do domínio Eukarya apresentando um total de 63.897 reads, seguido pelo domínio Bacteria com 15.049, Virus com 839 e Archaea com 59 (Figura 7).



**Figura 8:** Comparação taxonômica. Gráfico de barras representando a porcentagem entre filios bacterianos presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).

Vinte e dois filios pertencentes ao domínio Bactéria foram encontrados somando ambas as esponjas. Destes, 20 se encontram na esponja *A. crassa* e 7 na esponja *A. compressa*. O filo candidato Poribacteria (43%) apresentou a maior abundância na esponja *A. crassa*. Outros filios com maior abundância relativa em FT23 encontrados: foram Proteobacteria (25%), Chloroflexi (10%), Acidobacteria (6.3%), Actinobacteria (4.6%) e Cyanobacteria (1%). Em relação à esponja *A. compressa*, os filios com maior abundância relativa foram Proteobacteria (88%), Cyanobacteria (3.9%), candidatus Tectomicrobia (3.6%) e Bacteroidetes (1.5%). Dentre os filios identificados, Proteobacteria se encontra como o mais abundante para ambas as esponjas, com 13.358 reads para *A. crassa* e 10.644 reads para *A. compressa* (Figura 8).

As três classes que mais se destacaram em ambas as esponjas, foram Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. A classe Gammaproteobacteria foi mais abundante para ambas as esponjas, seguido de alphaproteobacteria para *A. crassa* e betaproteobacteria para *A. compressa*. Outras classes anotadas geralmente encontrados em esponjas foram Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria em *A. compressa* e Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria e betaproteobacteria para *A. crassa*.

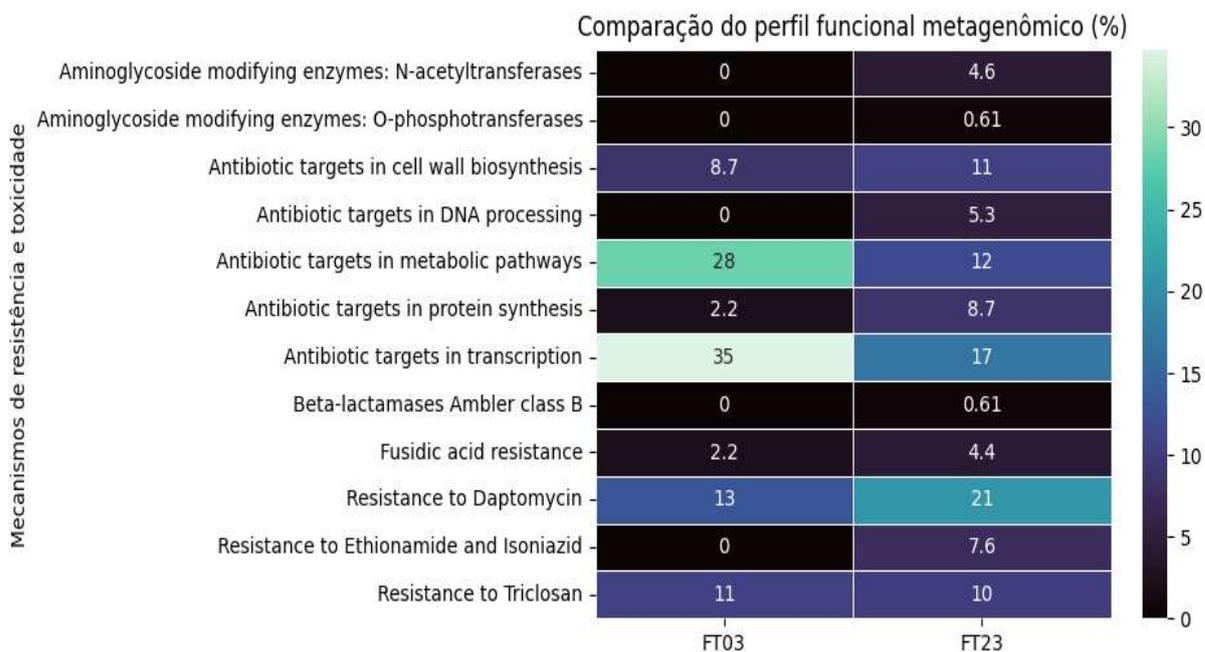
A relação de todos os gêneros identificados em ambas as esponjas podem ser observada na tabela 4. Os gêneros mais abundantes identificados em *A. compressa* foram: *Candidatus Thioglobus*, seguido por *Candidatus Entotheonella*, *Synechococcus*, *Cycloclasticus* e, por fim, *Pseudomonas*. Em contraste, os gêneros mais abundantes em *A. crassa* foram: *Candidatus Entotheonella*, *Synechococcus*, *Actinomyces*, *Candidatus Moanabacter* e *Candidatus Thioglobus*.

**Tabela 4:** Abundância em porcentagem dos gêneros bacterianos identificados em *A. crassa* e *A. compressa*.

<b>Gêneros <i>A. crassa</i> (%)</b>	
<i>Candidatus Entotheonella</i>	17,01
<i>Synechococcus</i>	14,69
<i>Actinomyces</i>	9,24
<i>Candidatus Moanabacter</i>	8,87
<i>Candidatus Thioglobus</i>	6,88
<i>Paenibacillus</i>	6,88
<i>Cycloclasticus</i>	6,85
<i>Gemmatimonas</i>	6,55
<i>Pseudomonas</i>	6,16
<i>Streptomyces</i>	4,89
<i>Mesorhizobium</i>	4,72
<i>Aphanocapsa</i>	4,43
<i>Thioalkalivibrio</i>	3,27
<b>Gêneros <i>A. compressa</i> (%)</b>	
<i>Candidatus Thioglobus</i>	44,29
<i>Candidatus Entotheonella</i>	20,49
<i>Synechococcus</i>	17,91
<i>Cycloclasticus</i>	13,14
<i>Pseudomonas</i>	4,16

#### 4.4 PERFIL FUNCIONAL DA MICROBIOTA

A busca por resistência a antibióticos e compostos tóxicos através dos programas DIAMOND/MEGAN encontrou resultados para ambas as esponjas. Para este grupo funcional, foram encontradas anotações de genes relacionados a antibióticos e genes relacionados à resistência em ambas as esponjas. Os mecanismos de resistência encontrados foram contra 6 classes de antibióticos. Os mecanismos foram: Aminoglicosídeo:N-acetyltransferases, Aminoglicosídeo:O-phosphotransferases, triclosan, daptomicina, Beta-lactamases Ambler class B, ácido fusídico e resistência a etionamida e isoniazida. Já os mecanismos relacionados à atividade antibiótica encontrados foram: inibidores da parede celular, inibidores da síntese de DNA (“*Antibiotic targets in transcription*” e “*Antibiotic targets in DNA processing*”), inibidores de atividade metabólica e Inibidores de síntese de proteína *Antibiotic targets in transcription*. (figura 9).



**Figura 9:** Comparação funcional em porcentagem dos diferentes mecanismos de resistência e toxicidade presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).

##### 4.4.1 Genes de resistência a antimicrobianos identificados

Realizamos um processo de identificação de genes relacionados à resistência contra antibióticos utilizando o programa Usearch. Identificamos um total de quinze genes relativos à amostra de *A. compressa* (tabela 5), sendo seis genes únicos e um

total de setenta e oito genes na amostra de *A. crassa* (tabela 6), sendo quinze genes únicos. Dentre eles, quatro são comuns às duas amostras; AAC(3)-IIb, rpoB2, Bado\_rpoB\_RIF e adeH. Os genes de resistência mais abundantes encontrados nas amostras somadas foram: rpoB2 (n=18), AAC(3)-IIb (n=17), SHV-160 (n=17), adeH (n=10) e Bado\_rpoB\_RIF (n= 7).

**Tabela 5:** Resultados de genes de resistência a antibióticos encontrados comparando proteínas preditas contra base de dados Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) para a amostra de *A. compressa*.

Gene	Classe	N genes encontrados
AAC(3)-IIb	aminoglycoside antibiotic	5
qacG	disinfecting agents and antiseptics	2
mtrD	macrolide antibiotic, penam	3
rpoB2	rifamycin antibiotic	1
Bado_rpoB_RIF	rifamycin antibiotic	2
adeH	tetracycline antibiotic, fluoroquinolone antibiotic	2

**Tabela 6:** Resultados de genes de resistência a antibióticos encontrados comparando proteínas preditas contra base de dados Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) para a amostra de *A. crassa*.

Gene	Classe	N genes encontrados
AAC(3)-IIb	aminoglycoside antibiotic	12
acrB	tetracycline antibiotic, glycylicycline, rifamycin antibiotic, disinfecting agents and antiseptics, phenicol antibiotic, cephalosporin, penam, fluoroquinolone antibiotic	3
adeH	tetracycline antibiotic, fluoroquinolone antibiotic	8
APH(3'')-Ib	aminoglycoside antibiotic	3
Bado_rpoB_RIF	rifamycin antibiotic	5

MexD	aminocoumarin antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, tetracycline antibiotic, aminoglycoside antibiotic, phenicol antibiotic, macrolide antibiotic, cephalosporin, fluoroquinolone antibiotic, penam	1
mtrC	macrolide antibiotic, penam	2
OXA-659	penam, cephalosporin, carbapenem (beta-lactâmicos)	1
patB	fluoroquinolone antibiotic	1
rpoB2	rifamycin antibiotic	17
rsmA	diaminopyrimidine antibiotic, phenicol antibiotic, fluoroquinolone antibiotic	3
Saur_mupA_MUP	mupirocin-like antibiotic	1
SHV-160	penam, cephalosporin, carbapenem	17
sul4	sulfonamide antibiotic	3
tet(C)	tetracycline antibiotic	2

#### 4.4.2 Atividade de antibióticos identificados

Os mecanismos de defesa utilizados pelas comunidades microbianas contra agentes externos e compostos tóxicos para persistir na esponja hospedeira, foram explorados a partir da análise de perfil funcional. Dentre os resultados, 4 mecanismos antibióticos foram encontrados: Inibidores da parede celular (*Antibiotic targets in cell wall biosynthesis*), Inibidores de atividade metabólica (*Antibiotic targets in metabolic pathways*), Inibidores de síntese de proteína (*Antibiotic targets in protein synthesis*) e Inibidores da síntese de DNA (*Antibiotic targets in transcription e Antibiotic targets in DNA processing*). Ambas as amostras se destacaram em abundância para Inibidores da síntese de DNA, de atividade metabólica e de parede celular.

#### 4.5 OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

As cinco famílias de bactérias identificadas que possuem espécies potencialmente patogênicas encontradas são: Mycobacteriaceae, Neisseriaceae, Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae e Vibrionaceae. Sendo os três últimos citados, comuns às duas amostras, Mycobacteriaceae exclusiva à *A. crassa* e Neisseriaceae exclusiva à *A. compressa*. Importante citar que os táxons citados acima são

potencialmente patogênicos, no entanto, possuem também bactérias não patogênicas. As respectivas abundâncias em relação às famílias presentes em cada esponja podem ser observadas na tabela 7. Além das famílias citadas, foi notada a presença da ordem Enterobacterales em *A. compressa* (1.44%) e *A. crassa* (0.7 %).

**Tabela 7:** Abundância relativa em porcentagem de famílias bacterianas possivelmente patogênicas presentes em *A. compressa* (FT03) e *A. crassa* (FT23).

Família	FT03 (%)	FT23 (%)
Mycobacteriaceae	0	2,11
Neisseriaceae	3,16	0
Burkholderiaceae	6,88	2,30
Pseudomonadaceae	5,58	3,64
Vibrionaceae	4,40	1,66

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA

Com base em estudos anteriores da matriz do tecido mesoólio das esponjas, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, *A. compressa* foi classificada como uma esponja LMA, enquanto *A. crassa* foi classificada como uma esponja HMA (GLOECKNER *et al.*, 2014). Geralmente, as esponjas HMA abrigam comunidades microbianas mais abundantes e diversas em comparação com as esponjas LMA (RUA *et al.*, 2015). Assim, o perfil taxonômico relativo às abundâncias de microrganismos encontrados em ambas as esponjas corresponde aos perfis anteriormente descritos em literatura. A esponja *A. compressa*, de perfil LMA, apresenta 80% de gene eucariótico em sua composição, que representa em grande parte o genoma da esponja (18.8%). O oposto é observado na amostra *A. crassa*, em que a porcentagem de genomas bacterianos é expressivamente maior que a porcentagem relativa ao genoma da esponja (88.5% e 9.53% respectivamente). Outros microrganismos encontrados apresentam abundância abaixo de 2,02% em ambas.

O perfil do microbioma encontrado em *A. compressa* corresponde a estudos anteriores que descrevem *A. compressa* como habitat para dois filos predominantes de microrganismos, Proteobacteria e Cyanobacteria, que juntos compõem mais de 50% da comunidade total de microbiomas presentes nessa esponja hospedeira (POTENS, 2016). As duas classes mais abundantes encontradas ambas as esponjas (Gammaproteobacteria, alphaproteobacteria) estão também dentre os mais abundantes presentes na água da pluma do rio Amazonas (SATINSKY *et al.*, 2014; SILVA, 2017).

Na composição de *A. crassa* estão presentes filos bacterianos dominantes relatados anteriormente em *A. crassa*, sendo estes: Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Acidobacteria (Souza, 2017). O filo candidato Poribacteria é comumente encontrado associado a esponjas, sendo particularmente notável, pois seus membros existem quase exclusivamente em esponjas marinhas (HENTSCHEL *et al.*, 2012). Além disso, observamos uma grande diversidade filogenética esperada em esponjas HMA, que apresenta 20 filos, dos quais 15 são descritos formalmente e 5 são candidatos conhecidos apenas por suas sequências. O oposto é observado na amostra da esponja LMA, com 7 filos, sendo 6 formais e 1 candidato.

Os gêneros mais abundantes identificados de *A. compressa* são Candidatus *Thioglobus*, seguido por Candidatus *Entotheonella*, *Synechococcus*, *Cycloclasticus*, por fim, *Pseudomonas*. Em contraste, os gêneros mais abundantes em *A. crassa* são Candidatus *Entotheonella*, *Synechococcus*, *Actinomyces*, Candidatus *Moanabacter* e Candidatus *Thioglobus*. Os gêneros *Synechococcus* e *Pseudomonas*, relatados em ambas as amostras, foram relatados também na pluma do Rio Amazonas (Silva, 2017).

## 5.2 PERFIL FUNCIONAL

A identificação dos genes de resistência a antibióticos e genes produtores de antibióticos em esponjas pode representar uma forma relevante de prospecção ambiental onde estas estão adaptadas. Neste tópico serão discutidas relações estabelecidas na literatura entre os resultados obtidos do Perfil Funcional da Microbiota e os genes de resistência mais abundantes encontrados nas amostras somadas.

De acordo com Arora (2014), dentre os microrganismos de maior preocupação para a saúde pública estão Enterobacteriaceae produtoras de betalactamase de espectro expandido, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus* resistente à vancomicina e Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase todas as quais podem causar infecções potencialmente altamente epidêmicas. Neste estudo foi identificada a presença de Enterobacterales e genes de resistência à carbapenem (OXA-659, SHV-160) em amostra da esponja *A. crassa*, no entanto, são resultados preliminares, sendo necessários mais dados para afirmar a correlação.

Aminoglicosídeos são antibióticos utilizados para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos aeróbicos, estafilococos e outros Gram-positivos, como *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose em humanos. A resistência contra a classe foi o terceiro mais relatado nas amostras, dentre essa classe, temos dois mecanismos identificados na anotação funcional: N-acetyltransferases e O-phosphotransferases. N-acetyltransferases estão relacionadas ao gene AAC(3)-IIb, encontrado em ambas as amostras. Este gene foi relatado em bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, (Enterobacterales), e no gênero *Paracoccus* (Rhodobacteraceae). Ambas as famílias estão presentes nas amostras estudadas (RAMIREZ, 2010). Já o mecanismo O-phosphotransferases está relacionado ao gene

APH(3)-Ib relatado em *Pseudomonas* spp. de acordo com Ramirez, (2010). O gene APH(3)-Ib e o gênero *Pseudomonas* foram ambos identificados em *A. crassa*.

Já o triclosan é um composto químico antimicrobiano amplamente utilizado em produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza e até mesmo em alguns produtos odontológicos. Ele pertence a uma classe de compostos conhecidos como fenóis halogenados. De acordo com Yazdankhah (2006) “O triclosan tem sido considerado um biocida, agindo por ruptura inespecífica (multialvo) de células bacterianas”. Diversos mecanismos de resistência a este composto podem ser encontrados em diversos nichos devido à sua larga utilização, como barreira de permeabilidade da membrana e mecanismos de efluxo, produção de enzimas de degradação, mutações em genes como o *acrAB* (codificando uma bomba de efluxo de múltiplas drogas) e outros (YAZDANKHAH, 2006; MCMURRY *et al.*, 1998). O gene *acrB* foi encontrado em *A. crassa*.

O mecanismo de resistência a daptomicina, encontrado nas duas esponjas, está em maior abundância em relação aos outros mecanismos. Suspeita-se que este mecanismo esteja relacionado ao gene *rpoB2* de resistência à rifamicina encontrado quando realizamos a busca contra base de dados CARD. Sabe-se que a família do gene *rpoB* possui mutações relacionadas à resistência contra daptomicina, rifamicina, vancomicina e beta-lactamases (BÆK, 2015). O gene *rpoB2* é encontrado na espécie *Nocardia farcinica* (ISHIKAWA J, *et al.*, 2006) e está pertence no filo Actinobacteria (ISHIKAWA *et al.*, 2006) encontrado em ambas as esponjas. Outro gene mutante de *rpo* identificado é o *Bado\_rpoB\_RIF*, comumente presente em *Bifidobacterium adolescentis* que confere resistência à rifampicina. Foi relatado pela primeira vez por Lokesh D, *et al.* em 2018 e é observado em espécies provenientes da família Bifidobacteriaceae, como *Gardnerella vaginalis* e *Bifidobacterium animalis* (STOESSER, 2023), no entanto esta família não foi identificada nas amostras.

A atividade Beta-lactamases Ambler class B parece estar relacionada à atividade do gene SHV-160 que atua através da inativação do antibiótico. Este gene está presente em *Klebsiella pneumoniae* (TAWFIK *et al.*, 2012; STOESSER *et al.*, 2023). Já o *adeH* é um gene de resistência relacionado ao mecanismo de bomba de efluxo, que é comumente relatado em *Acinetobacter baumannii* (HU *et al.*, 2018; STOESSER *et al.*, 2023), porém este gênero não foi descrito nas amostras.

A resistência ao ácido fusídico foi relatada no perfil funcional em ambas as amostras. O ácido fusídico é um dos antibióticos de uso tópico mais comumente utilizados. Ele é derivado do fungo *Fusidium coccineum* e vem sendo utilizado desde a década 60 principalmente contra infecções de pele e tecidos moles causados por estafilococos. Sua resistência está associada ao gene *fusC*. em *S. aureus* (RIBEIRO, 2020). No entanto, genes relacionados a esta função não foram identificados no presente trabalho, sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmar a presença ou ausência deste gene.

Já a resistência a etionamida e isoniazida foi relatada no perfil funcional de *A. crassa*. Tanto a etionamida quanto a Isoniazida são drogas utilizadas no tratamento contra a *M. tuberculosis*, causadora da tuberculose em humanos. A isoniazida vem sendo utilizada desde 1952 e sua resistência em *M. tuberculosis* é conferida pela mutação dos genes *katG*, *ahpC* e *inhA* e *oxyR* não relatados no presente estudo. Já a etionamida, é uma droga específica para micobactéria, sendo utilizada como alternativa ao tratamento com isoniazida, como em casos de tuberculose multiresistente. As mutações presentes em cepas resistentes são relacionadas aos genes *ethA* e *ethR*. (VERZA, 2008; SANDOVAL, 2020)

Em relação aos mecanismos relacionados à resistência aos antibióticos, os mais abundantes para ambas as amostras foram, respectivamente, os antibióticos Inibidores da síntese de DNA e de atividade metabólica. No entanto, a maioria dos antibióticos aprovados para uso clínico e utilizados no mercado tem como alvo a integridade da parede celular bacteriana, bem como Inibidores de síntese de proteína e Inibidores da síntese de DNA (MA, 2016), podendo indicar um bom sinal.

Em relação aos antibióticos com alvo na transcrição ("*Antibiotic targets in transcription*" e "*Antibiotic targets in DNA processing*"), existem apenas duas classes no mercado aprovadas: rifamicina e fidaxomicina. (MA *et al.*, 2016). ARGs relacionados à rifamicina foram encontrados em ambas as amostras, com 28 genes relacionados. Já os antibióticos com alvo em vias metabólicas atuam bloqueando a capacidade de uma célula bacteriana sintetizar metabólitos essenciais, como é o exemplo da Sulfonamida e Diaminopirimidinas (ZINNER *et al.*, 2015), cujas ARGs foram identificadas em *A. crassa*.

O terceiro grupo de antibióticos mais abundante em ambas as esponjas foram aqueles inibidores da parede celular. Este alvo foi o primeiro ser explorado no

tratamento contra bactérias e continua sendo o economicamente mais significativo, apesar dos avanços preocupantes em resistência. Dentre os antibióticos com este alvo, temos os beta-lactâmicos (penicilina), cefalosporina e carbapenema) e glicopeptídeos (SCHNEIDER *et al.*, 2010). Neste estudo também foram relatados mecanismos de resistência contra os antibióticos beta-lactâmicos citados, através do método mais refinado (usearch). Por fim, o grupo menos abundante foi de antibióticos Inibidores de síntese de proteína, cujos ARGs encontrados nas amostras foram Aminoglicosídeo, Tetraciclina, Fenicol e Macrolídeo (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; MCCOY *et al.*, 2011). Antibióticos com ação inibitória da membrana celular e ARGs relacionadas não foram encontrados nas amostras.

Os dados relacionados aos mecanismos de ação e dos ARGs podem indicar a presença de clusters gênicos de produção e resistência no microbioma das esponjas, visto que as bactérias produtoras de antibióticos possuem genes de resistência que as protegem das moléculas biologicamente ativas que elas mesmas produzem, fazendo com que a ativação dos genes de resistência esteja ligada à produção de antibióticos (MAK *et al.*, 2014). Além de mecanismos intrínsecos à evolução conjunta da comunidade microbiana, onde as bactérias presentes desenvolveram mecanismos de resistência frente a produção de antibiótico de outras espécies hospedeiras.

### 5.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

A presença do gênero *Pseudomonas*, pertencente à família Pseudomonadaceae, foi identificada em ambas as esponjas neste estudo e é descrita na pluma do Rio Amazonas por estudo anterior (SILVA, 2017). Além disso, foram identificados gene de resistência e perfil funcional relacionado, nos resultados anteriores, tornando provável sua presença na esponja, com perfil de resistência. De acordo com Silva (2017), este gênero é reconhecido por abrigar espécies patogênicas para os seres humanos, mas também por sua capacidade degradadora de matéria orgânica, visto que possuem ampla capacidade de degradar diferentes tipos de matéria orgânica, incluindo compostos aromáticos e moléculas de difícil degradação. Elas desempenham um papel importante na degradação de matéria orgânica animal e vegetal proveniente da decomposição de plantas e animais. No entanto, por mais que este gênero cumpra seu papel ambiental, não se pode descartar a possibilidade da ação antropogênica para a seleção de resistência neste grupo.

O gênero *Burkholderia*, pertencente à família Burkholderiaceae foi identificado em trabalhos anteriores envolvendo *A. compressa* e *A. crassa* local, assim como o gênero *Vibrio* da família Vibrionaceae em *A. compressa* (MENEZES, 2020). *Burkholderia* abriga espécies patogênicas para os seres humanos, mas também está associado a raízes de plantas e é bem distribuída em vários ambientes (SILVA, 2017). Dessa forma, sua presença no ambiente marinho é comum e pode não indicar patogenicidade, podendo estar associadas ao microbioma das esponjas também como consequência das taxas de bombeamento, especialmente em *A. compressa*, que apresentou um número expressivo de *reads* para Burkholderiaceae. A espécie *Vibrio cholerae* foi identificada na pluma como um potencial indício de influência antropogênica no Rio Amazonas (SILVA, 2017). No entanto, seu gênero não foi identificado nas amostras no presente estudo.

Por mais que a família Mycobacteriaceae tenha sido relatada em *A. crassa*, não há evidências para o gênero *Mycobacterium* nas esponjas. No entanto, já foi observada a presença deste gênero na pluma do rio (SILVA, 2017). Além disso, de acordo com o perfil funcional, foi detectada a presença de mecanismos contra os antibióticos etionamida e Isoniazida, utilizadas no tratamento contra *Mycobacterium tuberculosis* na amostra de *A. crassa*. Em relação à família Neisseriaceae, não foram identificadas leituras ao nível de gênero ou evidências em literatura que corroboram com a presença de bactérias patogênicas pertencentes a este táxon, sendo necessários mais dados para realizar conclusões a respeito da patogenicidade.

## 6 CONCLUSÃO

Em relação aos perfis taxonômicos das esponjas, este estudo mostrou que as comunidades microbianas encontradas em ambas as esponjas são consistentes com as classificações de LMA para *A. compressa* e HMA para *A. crassa*. Além disso, foram encontrados filos bacterianos dominantes específicos em cada esponja, como Proteobacteria e Cyanobacteria em *A. compressa*, e Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria e Acidobacteria em *A. crassa*.

A identificação taxonômica ao nível de gênero teve baixa precisão, no entanto, foram identificados gêneros mais abundantes em cada esponja, como *Candidatus Thioglobus*, *Candidatus Entotheonella*, *Synechococcus*, *Cycloclasticus* e *Pseudomonas* em *A. compressa*, e *Candidatus Entotheonella*, *Synechococcus*, *Actinomyces*, *Candidatus Moanabacter* e *Candidatus Thioglobus* em *A. crassa*. Alguns desses gêneros também foram encontrados na pluma do Rio Amazonas, apoiando os estudos sobre a influência da pluma do rio Amazonas sobre a composição taxonômica de microrganismos associados às esponjas.

Em relação ao perfil funcional, foram identificados genes de resistência a antibióticos, como rpoB2, AAC(3)-IIb, SHV-160, adeH e Bado\_rpoB\_RIF. Além disso, foram encontrados mecanismos antimicrobianos relacionados a diferentes alvos, como biossíntese da parede celular, processamento de DNA, vias metabólicas, síntese de proteínas e transcrição. Alguns desses genes de resistência se relacionam com os antimicrobianos detectados no perfil funcional, como no caso de rifamicina em ambas as esponjas e Sulfonamida e Diaminopirimidinas para *A. crassa*, podendo indicar a presença de clusters gênicos de produção e resistência no microbioma das esponjas. Não foram encontrados antibióticos com ação inibitória da membrana celular nas amostras analisadas.

Quanto a microrganismos patogênicos, foram relatados gêneros como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Vibrio*, que podem abrigar espécies patogênicas para os seres humanos. No entanto, a presença desses gêneros nas esponjas pode estar relacionada a suas funções ambientais, como a degradação de matéria orgânica, e não necessariamente indicar patogenicidade. Há indícios da presença dos gêneros

*Mycobacterium* e *Vibrio* nas amostras, que podem ser consequências da ação antrópica, no entanto, mais dados são necessários para esta afirmação.

## **7 PERSPECTIVAS**

O resultado da predição de genes de resistência pode ainda ser melhorado com a utilização de técnicas mais avançadas da bioinformática, como programas baseados em algoritmos de *machine learning*, melhorando assim a sensibilidade e especificidade. Para a confirmação de quais genes estão envolvidos na produção de antibióticos cujos mecanismos de ação foram citados na anotação de perfil funcional, é possível utilizar o Antismash (Blin, 2023). Este programa é capaz de executar uma busca mais acurada por clusters gênicos de produção de antibióticos analisando os contigs gerados relacionando-os com metabólitos secundários in silico que foram previamente publicados.

## REFERÊNCIAS

ABUSHAHEEN, M.A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/tc37\\_projeto\\_231106.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/tc37_projeto_231106.pdf)> Acessado em: 14 abril. 2023

ARANGO-ARGOTY, G. *et al.* DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. **Microbiome**, v. 6, p. 1-15, 2018.

ARORA; GAUTAM, V., RANA, S., RAY, P. Novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, methicillin resistant Staphylococcus aureus and vancomycin resistant Enterococcus. **J. Medical Investigations and Practice**. 2014

BÆK, K.T. *et al.* Stepwise decrease in daptomycin susceptibility in clinical Staphylococcus aureus isolates associated with an initial mutation in rpoB and a compensatory inactivation of the clpX gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 6983-6991, 2015.

BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G. J. Invertebrados. 2 ed. Editora Guanabara Koogan, 2006.

BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature methods**, v. 18, n. 4, p. 366-368, 2021.

CARRIER, T.J. *et al.* Symbiont transmission in marine sponges: reproduction, development, and metamorphosis. **BMC biology**, v. 20, n. 1, p. 100, 2022.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta: Department of Health and Human Services – CDC, 2019.

COLES, V.J. *et al.* The pathways and properties of the Amazon River Plume in the tropical North Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 118, n. 12, p. 6894-6913, 2013.

D'ELIA, M.A.; PEREIRA, M. P.; BROWN, E. D. Are essential genes really essential?. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 10, p. 433-438, 2009.

DAS, B.K. *et al.* Metagenomic study focusing on antibiotic resistance genes from the sediments of River Yamuna. **Gene**, v. 758, p. 144951, 2020.

DE CARVALHO, F.M. *et al.* Exploring the bacteriome and resistome of humans and food-producing animals in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e00565-22, 2022.

DE MAHIQUES, M.M. *et al.* Insights on the evolution of the living Great Amazon Reef System, equatorial West Atlantic. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13699, 2019.

DINSDALE, E.A. *et al.* Multivariate analysis of functional metagenomes. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 41, 2013.

EDGAR, R.C.; FLYVBJERG, H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. **Bioinformatics**, v. 31, n. 21, p. 3476-3482, 2015.

FRANCINI-FILHO, R.B. *et al.* Perspectives on the Great Amazon Reef: extension, biodiversity, and threats. **Frontiers in Marine Science**, p. 142, 2018.

FRÓES, A.M. *et al.* Distribution and classification of serine  $\beta$ -lactamases in Brazilian hospital sewage and other environmental metagenomes deposited in public databases. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1790, 2016.

FUERST, J.A. Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 7331-7347, 2014.

GILES, E.C. *et al.* Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 1, p. 232-241, 2013.

GLOECKNER, V. *et al.* The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscopical survey of 56 sponge species. **The Biological Bulletin**, v. 227, n. 1, p. 78-88, 2014.

GUAN, Y. *et al.* Metagenomic assembly and binning analyses the prevalence and spread of antibiotic resistome in water and fish gut microbiomes along an environmental gradient. **Journal of Environmental Management**, v. 318, p. 115521, 2022.

HANDELSMAN J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68(4):669-85, 2004.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol**, 1998.

HENTSCHEL, UTE, TAYLOR M.W. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. **ISME Journal**, 6, 564–576, 2012

HENTSCHEL *et al.* Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 641-654, 2012.

HENTSCHEL, UTE; USHER, K.M.; TAYLOR, M.W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS microbiology ecology**, v. 55, n. 2, p. 167-177, 2006.

HOOPER, J.N.A; VAN SOEST, R.W.M. Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. In: **Systema Porifera: A guide to the classification of sponges**. Boston, MA: Springer Us, 2002. p. 1-7.

HU, Y. *et al.* Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 2151, 2013.

HU, C. *et al.* In vitro synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the AdeABC efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Plos one**, v. 13, n. 6, p. e0198061, 2018.

HUSON, D.H. *et al.* MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 6, p. e1004957, 2016.

HYATT, D. *et al.* Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC bioinformatics**, v. 11, p. 1-11, 2010.

HYATT, A. "Revision of the North American Poriferae: With Remarks Upon Foreign Species. Parts 1, 2." **Boston Society of Natural History**, 1875.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 26, DE 9 DE JULHO DE 2009. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacaoanimal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>. Acesso em: 22/06/2021.

ISHIKAWA, J. *et al.* Contribution of rpoB2 RNA polymerase  $\beta$  subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1342-1346, 2006.

KIM, K.H. *et al.* *Acetobacter oryzifermentans* sp. nov., isolated from Korean traditional vinegar and reclassification of the type strains of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (Henneberg 1898) and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus* (Frateur 1950) as *Acetobacter ascendens* sp. nov., comb. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-332, 2018.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, jun. 2010.

KOMOLAFE, O.O. Antibiotic resistance in bacteria-an emerging public health problem. **Malawi medical journal**, 15(2): 63-67, 2003.

KONSTANTINOU, Despoina *et al.* Bioprospecting sponge-associated marine cyanobacteria to produce bioactive compounds. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 73, 2020.

KOONIN, E.V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 309-338, 2005.

LEAL, C.V. *et al.* Sponges present a core prokaryotic community stable across Tropical Western Atlantic. **Science of the Total Environment**, v. 835, p. 155145, 2022.

LI, D. *et al.* MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674-1676, 2015.

LING, L.L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455-459, 2015.

LIU, B.; POP, M. ARDB—antibiotic resistance genes database. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl\_1, p. D443-D447, 2009.

Lokesh, D. *et al.* Bifidobacterium adolescentis is intrinsically resistant to antitubercular drugs. **Sci Rep** 8(1):11897, 2018.

MA, C.; YANG, X.; LEWIS, P.J. Bacterial transcription as a target for antibacterial drug development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 139-160, 2016.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAK, S.; XU, Y.; NODWELL, J.R. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. **Molecular microbiology**, v. 93, n. 3, p. 391-402, 2014.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa número 26, de 9 de julho de 2009. Disponível em: <instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf (www.gov.br)> Acesso em: 15 abril. 2023

MCCOY, L.S.; XIE, Y.; TOR, Y. Antibiotics that target protein synthesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 2, p. 209-232, 2011.

MCMURRY, L.M.; OETHINGER, M.; LEVY, S.B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 531-532, 1998.

MENEZES, T. A. **Microbiomas de holobiontes esponjas do Grande Recife Amazônico**. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2020.

MENEZES, T. A. *et al.* Fluxes of the Amazon River plume nutrients and microbes into marine sponges. **Science of The Total Environment**, v. 847, p. 157474, 2022.

MOITINHO-SILVA, L. *et al.* Predicting the HMA-LMA status in marine sponges by machine learning. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 752, 2017.

MONIER, J. *et al.* Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 229-235, 2011.

MOTA, L.M. *et al.* Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MOURA, R.L. *et al.* An extensive reef system at the Amazon River mouth. **Science advances**, v. 2, n. 4, p. e1501252, 2016.

MULVEY, M.R.; SIMOR, Andrew E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be?. **Cmaj**, v. 180, n. 4, p. 408-415, 2009.

MURRAY P.R., ROSENTHAL K.S., PFALLER M.A. **Microbiologia Medica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NAYFACH, S. *et al.* Consortium IMD, Woyke T, Mouncey NJ, Ivanova NN, Kyrpides NC, Eloe-Fadrosh EA, IMG/M Data Consortium. **A genomic catalog of Earth's microbiomes.** *Nat Biotechnol*, v. 39, p. 499-509. 2021.

NAZIR, A. Review on metagenomics and its applications. **Imperial Journal Of Interdisciplinary Research**, 2(3): 277-286, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NICACIO, K.J. *et al.* Cultures of the marine bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of natural products**, v. 80, n. 2, p. 235-240, 2017.

DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ, B.; BOURY-ESNAULT, N. *et al.* **World Porifera Database.** *Amphimedon compressa* (Duchassaing & Michelotti, 1864). 2023 Disponível em: <<https://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=166666>>. Acesso em: Fev. 2023

NIVINA, A.; YUET, K. P.; HSU, J.; KHOSLA, C.; Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases Focus Review. **Chemical Review**. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00525, 2019.

O'NEILL, E.C. *et al.* Targeted antibiotic discovery through biosynthesis-associated resistance determinants: Target directed genome mining. **Critical reviews in microbiology**, v. 45, n. 3, p. 255-277, 2019.

O'NEILL, J. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS: THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant Infections globally, [s. l.], Maio 2016. Disponível em: [https://amrreview.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf). Acesso em: 15 abril. 2023.

PELAEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat?. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 981-990, 2006.

POTENS, R.M. **Characterization of the Marine Sponge *Amphimedon compressa* Microbiome Across a Spatial Gradient.** Tese (Mestrado em Ciências)- Faculty of Nova Southeastern University, Halmos College of Natural Science and Oceanography. 2016.

RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, Marcelo E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug resistance updates**, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

RIBEIRO, R. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de animais de companhia.** 2020. Tese de Doutorado.

RUA, C.P.J. *et al.* Microbial and functional biodiversity patterns in sponges that accumulate bromopyrrole alkaloids suggest horizontal gene transfer of halogenase genes. **Microbial ecology**, v. 76, p. 825-838, 2018.

RUA, C.P.J. *et al.* Potential metabolic strategies of widely distributed holobionts in the oceanic archipelago of St Peter and St Paul (Brazil). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 6, p. fiv043, 2015.

SALIB, M.N.; HENDRA, R.; MOLINSKI, T.F. Bioactive bromotyrosine alkaloids from the Bahamian marine sponge *Aiolochoia crassa*. Dimerization and Oxidative Motifs. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 12831-12843, 2022.

SANDOVAL, R. *et al.* Resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida y su alta correlación con la mutación C-15T en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de Perú. **Revista argentina de microbiología**, v. 52, n. 1, p. 37-42, 2020.

SATINSKY, B.M. *et al.* The Amazon continuum dataset: quantitative metagenomic and metatranscriptomic inventories of the Amazon River plume, June 2010. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

SCHNEIDER, T.; SAHL, H. An oldie but a goodie—cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 161-169, 2010.

SANDOVAL, R. *et al.* Resistencia cruzada entre isoniacida y etionamida y su alta correlación con la mutación C-15T en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de Perú. **Revista argentina de microbiología**, v. 52, n. 1, p. 37-42, 2020.

SETUBAL, J.C. Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. **Biophysical Reviews**, v. 13, n. 6, p. 905-909, 2021.

SILVA B.S.O. **Caracterização taxonômica e funcional de comunidades microbianas do baixo rio e da pluma do Rio Amazonas**. 2017. Tese (Doutorado em BIODIVERSIDADE E BIOLOGIA EVOLUTIVA) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2017.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Guanabara Koogan, 7ª edição, 2016.

STOESSER, G.; GRIFFITH, M.; GRIFFITH, O.L. NCBI (National center for biotechnology information). **Dictionary of bioinformatics and computational biology**, 2023.

STOLL, C. *et al.* Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 17, p. 9716-9726, 2012.

TAWFIK, A.F. *et al.* Distribution of Ambler class A, B and D  $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Burns**, v. 38, n. 6, p. 855-860, 2012.

TAYLOR, M.W. *et al.* Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

THOMPSON, M.N. *et al.* Bioactivity of amphitoxin, the major constituent of the Jamaican sponge *Amphimedon compressa*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 8, p. 1904-1910, 2010.

VARSHA, M.S. *et al.* Biodiversity of sponges (Phylum: Porifera) off Tuticorin, India. **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 62, n. 2, p. 40-57, 2020.

VERZA, M. **Detecção da mutação mais freqüente no códon 315 do gene katG relacionada com a resistência à isoniazida em isolados de Mycobacterium tuberculosis**. Tese (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008.

VIEIRALVES, Thomáz. **Distinção de espécies de Amphimedon Duchassaing & Michelotti, 1864 (Niphatidae, Haplosclerida, Demospongiae) da costa brasileira por estudos de diversidade genética e morfológica**. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Museu Nacional, Rio de Janeiro.2004.

WANG, Z. *et al.* ARG-SHINE: improve antibiotic resistance class prediction by integrating sequence homology, functional information and deep convolutional neural network. **NAR Genomics and Bioinformatics**, v. 3, n. 3, p. lqab066, 2021.

WEBSTER, N.S.; THOMAS, Torsten. The sponge hologenome. **MBio**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/mbio.00135-16, 2016.

WEISZ, J.B.; LINDQUIST, Niels; MARTENS, Christopher S. Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? **Oecologia**, v. 155, p. 367-376, 2008.

WHO – World Health Organization. Antibiotic resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>> Acesso em: 15 abril. 2023

YAZDANKHAH, S.P. *et al.* Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microbial drug resistance**, v. 12, n. 2, p. 83-90, 2006.

ZHONG, Z. *et al.* Challenges and advances in genome mining of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 155-172, 2020.

ZINNER, S.H.; MAYER, Kenneth H. Sulfonamides and trimethoprim. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. WB Saunders. p. 410-418. e2. 2015.