

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CLÁUDIA BEATRIZ AFONSO DE MENEZES

**TAXONOMIA POLIFÁSICA COM ÊNFASE EM *MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS*
(MLSA) E BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE ACTINOMICETOS
ISOLADOS DE AMBIENTE MARINHO**

**POLYPHASIC TAXONOMY EMPHASIZING *MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS*
(MLSA) AND BIOPROSPECTING OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM MARINE ENVIRONMENT**

Campinas

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

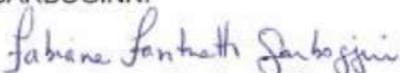
CLÁUDIA BEATRIZ AFONSO DE MENEZES

“TAXONOMIA POLIFÁSICA COM ÊNFASE EM *MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS* (MLSA) E BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE AMBIENTE MARINHO”

“POLYPHASIC TAXONOMY EMPHASIZING *MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS* (MLSA) AND BIOPROSPECTING OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ACTINOMYCETES ISOLATED FROM MARINE ENVIRONMENT”

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutora em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA CLÁUDIA BEATRIZ
AFONSO DE MENEZES, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. FABIANA
FANTINATTI GARBOGINNI


Orientadora: Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Campinas
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M524t Menezes, Cláudia Beatriz Afonso de, 1977-
Taxonomia polifásica com ênfase em *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e bioprospecção de compostos bioativos de actinomicetos isolados de ambiente marinho / Cláudia Beatriz Afonso de Menezes. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Actinobactéria – Classificação. 2. Agentes antivirais. 3. Atividade antimicrobiana. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Polyphasic taxonomy emphasizing *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) and bioprospecting of bioactive compounds from actinomycetes isolated from marine environment

Palavras-chave em inglês:

Actinobacteria – Classification

Antiviral agent

Antimicrobial activity

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabiana Fantinatti Garboggini [Orientador]

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Edmilson Ricardo Gonçalves

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Data de defesa: 28-04-2015

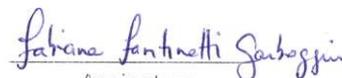
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

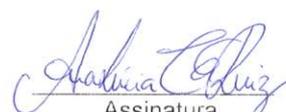
Campinas, 28 de abril de 2015.

BANCA EXAMINDORA

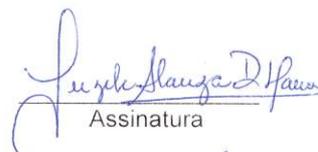
Profa. Dra Fabiana Fantinatti Garboginni (Orientadrea)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz


Assinatura

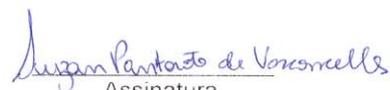
Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano


Assinatura

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves


Assinatura

Profa. Suzan Pantaroto de Vasconcellos


Assinatura

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Profa. Dra. Luciana Campos Paulino

Assinatura

RESUMO

O ambiente marinho representa uma importante fonte de diversidade biológica com grande potencial para descoberta de novos metabólitos secundários biologicamente ativos. Dentro desse ambiente, pode-se destacar os actinomicetos marinhos, cujos estudos podem contribuir para a melhor compreensão de suas funções ecológicas e para seu uso como uma fonte importante de novos metabólitos. A taxonomia dos actinomicetos é bastante complexa e a metodologia de MLSA, ferramenta alternativa em estudos de sistemática microbiana, pode ser uma técnica importante na caracterização de actinomicetos. Novos metabólitos secundários tem sido isolados de actinomicetos marinhos, sendo as atividades antibacteriana e anticâncer as principais descritas, porém pouco se conhece sobre a atividade antiviral deste grupo de micro-organismos. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade de actinomicetos associados ao ambiente marinho, utilizando uma abordagem polifásica, associada à avaliação das atividades antimicrobiana e antiviral destas bactérias. No total, foram obtidos 579 isolados de bactérias oriundos de macro-organismos marinhos coletados no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. Desses, 72 foram identificados por análise de sequência do gene RNA ribossomal 16S, como actinomicetos, e nove isolados foram descritos como novas espécies de actinobactérias pertencentes aos gêneros *Gordonia* (B204), *Marmoricola* (B374), *Williamsia* (B138, B375 e B452), *Serinicoccus* (B736), *Kineococcus* (B366), *Knoellia* (B175) e *Janibacter* (B742). A caracterização polifásica dessas novas espécies de actinobactérias foi realizada pela técnica de hibridação DNA-DNA, *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) utilizando genes conservados (*rpoB*, *rpoA*, *gyrB*, *recA* e *trpB*), análise de perfil de ácidos graxos e microscopia eletrônica. A caracterização dos isolados foi complementada por testes fisiológicos e quimiotaxonômicos, tais como a determinação do conteúdo de GC, lipídios polares, menaquinonas, testes de utilização de fontes de carbono, atividade enzimática, degradação de compostos e tolerância a antibióticos, pH e temperatura. Quanto ao potencial biotecnológico dos 72 isolados de actinobactérias avaliados, 16 isolados apresentaram potencial antimicrobiano e 13 potencial antiviral. Os extratos dos isolados B175 (CIM = 1 mg/mL), B375 (CIM = 2 mg/mL), B138 (CIM = 1 mg/mL) e B366 (CIM = 2 mg/mL) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O extrato do isolado B374 apresentou atividade antiviral frente ao vírus Metapneumovírus aviário (aMPV), os isolados B366 e B742, frente ao herpes

vírus simplex do tipo 1 (HSV-1), os isolados B138 e B452 frente ao vírus Calicivírus Felino (FCV) e o isolado B204 frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). A partir deste trabalho, pode-se concluir que existe grande diversidade de micro-organismos marinhos a ser descoberta e explorada, como fonte de novas espécies e compostos com potencial biotecnológico.

Palavras-chaves: Taxonomia Polifásica; Actinobactérias, Atividade Antiviral e Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

The marine environment is an important source of biological diversity for potential with isolation of novel microorganisms to produce biologically active secondary metabolites. The diversity of marine actinomycetes is great and the knowledge of this diversity can contribute to the understanding of its ecological functions and provide an important source for the discovery of new metabolites. The taxonomy of actinomycetes is quite complex and the MLSA methodology, alternative tool in microbial systematic studies, can be an important technique in the characterization of actinomycetes. New secondary metabolites have been isolated from marine actinomycetes, and the anticancer and antibacterial activities the major described, however little is known antiviral activity. The aim of this study was the use of polyphasic approach to evaluate the diversity of actinomycetes associated with marine invertebrates collected in the northern coast of São Paulo, Brazil and the production of metabolites with activities: antimicrobial and antiviral. Bacteria (579) were obtained originating from marine macro-organisms. Of these, 72 were characterized as actinomycetes, by molecular taxonomy based on sequencing of 16S ribosomal RNA gene and nine isolates were described as new species of actinomycetes belonging to the genera *Gordonia* (B204), *Marmoricola* (B374), *Williamsia* (B138, B375 and B452), *Serinicoccus* (B736), *Kineococcus* (B366) *Knoellia* (B175) and *Janibacter* (B742). The polyphasic characterization of these new species of actinomycetes was performed by DNA-DNA hybridization technique, *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) using conserved genes (*rpoB*, *rpoA*, *gyrB*, *recA* e *trpB*), profile analysis of fatty acids and electron microscopy. Characterization was completed by chemotaxonomic and physiological tests such as the determination of the GC content, polar lipid, menaquinones, carbon sources, enzymatic activity, compounds degradation, antibiotics resistance, pH and temperature. As for the biotechnological potential of the 72 isolates of actinomycetes evaluated, 16 isolates had antimicrobial potential and 13 antiviral potential. Crude extract of isolates B175 (MIC = 1 mg / ml), B375 (MIC = 2 mg / ml), B138 (MIC = 1 mg / ml) and B366 (MIC = 2 mg / mL) showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Crude extracts B374 showed antiviral activity against avian Metapneumovirus virus (AMPV), B366 and B742 against the herpes simplex virus type 1 (HSV-1), B138 and B452 against feline calicivirus virus (FCV) and B204 against bovine viral diarrhea virus (BVDV). From this study, it can be concluded that the marine environment has

a great diversity of microorganisms to be discovered and explored as well as a source of novel species and compounds with biotechnological potential.

Keywords: Polyphasic Taxonomy; Actinomycetes; Antiviral Activity and Antimicrobial Activity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. DIVERSIDADE MICROBIANA MARINHA	2
2.2. ACTINOBACTÉRIA	4
2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS	5
2.4. TAXONOMIA POLIFÁSICA	10
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPÍTULO 1. DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA A AMBIENTE MARINHO	22
ARTIGO : MICROBIAL DIVERSITY ASSOCIATED WITH ALGAE, ASCIDIANS AND SPONGES FROM THE NORTH COAST OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL	23
CAPÍTULO 2. TAXONOMIA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTE MARINHO	40
2. INTRODUÇÃO	41
2.1. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1.1. COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	42
2.1.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	44
2.1.3. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS	44
2.1.3.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	44
2.1.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE RNA RIBOSSOMAL 23S COM PRIMERS GRUPO-ESPECÍFICO	45
2.1.3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA COM BASE NO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S	46
2.2. TAXONOMIA POLIFÁSICA PARA DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES	47
2.2.1. <i>MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)</i>	47
2.2.2. HIBRIDAÇÃO DNA-DNA	49
2.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO ΔT_m ENTRE AS ESPÉCIES EM PLATAFORMA DE RT-PCR	50

2.2.2.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GC E DA TEMPERATURA ÓTIMA DE RENATURAÇÃO (TOR)	51
2.2.3. TESTES QUIMIOTAXONÔMICOS	51
2.2.3.1. PREPARO DO INOCULO	52
2.2.3.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME)	52
2.2.3.3. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS MURÂMICOS	53
2.2.3.4. EXTRAÇÃO DE MENAQUINONAS E LIPÍDEOS POLARES	54
2.2.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	55
2.2.5. TESTES BIOQUÍMICOS	56
2.2.5.1. TESTES DE DEGRADAÇÃO	56
2.2.5.2. PERFIL METABÓLICO DE FONTES DE CARBONO	57
2.2.5.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	57
2.2.6. TESTES DE TOLERÂNCIA	57
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
2.3.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	58
2.3.2. SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS	59
2.3.3. MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)	68
2.3.4. CONTEÚDO DE GC E HIBRIDAÇÃO DNA-DNA	76
2.3.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ACTINOMICETOS	79
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS ACTINOBACTÉRIAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIVIRAL	101
3. INTRODUÇÃO	102
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	103
3.1.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO	103
3.1.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	104
3.1.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	105
3.1.3.1. MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS	107
3.1.3.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÁXIMA NÃO TÓXICA	107
3.1.3.3. ENSAIO ANTIVIRAL	108
3.1.3.4. MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	109
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	109

3.2.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	109
3.2.2. ATIVIDADE ANTIVIRAL	114
3.2.3. MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	119
3.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
4. DISCUSSÃO GERAL	126
5. CONCLUSÕES	128
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	129
7. APÊNDICES	130
8. ANEXOS	175

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini, pela paciência, competência e dedicação, contibuição para meu crescimento profissional, amizade, confiança e por acreditar na minha capacidade.

Aos colaboradores Dr. Tiago Domingues Zucchi, Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Dr. Itamar Soares de Melo, Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, Dra. Luciana Konecny Kohn, Dra. Clarice Weis Arns, Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

À banca examinadora Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves e Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos.

À toda equipe da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do CPQBA/UNICAMP. À Milena, João, Rebeca e Mariana, pelos cuidados com as minhas bactérias. E à Bianca e Rafael pela ajuda com os ensaios. À Rafaella, Paula, Bárbara e Michel, pelo trabalho em equipe no início do projeto.

À Divisão de Fitoquímica do CPQBA/UNICAMP, sob supervisão da Dra Mary Ann Foglio e Dr. Rodney Alexandre Rodrigues e apoio de Ilza na obtenção dos extratos brutos.

À Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, sob supervisão da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, pela estrutura e orientação com os testes antimicrobianos e agradeço ao também ao apoio da Vivian, Márcio e Camila.

À equipe do Instituto Biológico Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano e suas alunas Daniele, Mariana, Celinha, Lu e Marcela.

À Equipe da Embrapa Meio Ambiente/Jaguaríuna, Dr. Itamar Soares de Melo, Dr. Tiago Domingues Zucchi, Dra. Suikinai Nobre Santos, Márcia Maria Parma, Rafael Vasconcelos, Rafael, Danilo, Fábio, Leonardo, Wallace e Camila.

Ao Laboratório de Virologia da UNICAMP, sob supervisão da Dra. Clarice Weis Arns, e apoio da Dra. Luciana Konecny Kohn, Paula, Marina e Juliana.

À querida amiga Fernanda Sentoma, que ficou no meu pé até finalizar esse trabalho.

Aos amigos Rafael Neto, Camila Carlos, Juliana Costa, Kátia Mattos e Sheila Cristina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP
2009/13778-4) pelo apoio financeiro.

Ao CPQBA/UNICAMP por toda estrutura oferecida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do número de bactérias isoladas por meio de cultivo para cada fonte de isolamento (organismos marinhos e água do mar). **59**

Figura 2. Amplificação de 375 pb da região do gene RNA ribossomal 23S com *primers* grupo-específicos (231nsV/23InsR). Amplificação a partir de 50 ng de DNA dos isolados: **1.** B204 (*Brevibacterium* sp.); **2.** B299 (*Brevibacterium* sp.) **3.** B255 (*Janibacter* sp.); **4.** B266 (*Micrococcus* sp.); **5.** B506 (*Saccharopolyspora* sp.); **6.** B305 (*Microbacterium* sp.); **7.** CBMAI 310 (*Chromobacterium* sp.); **8.** CBMAI 534^T (*Chromobacterium violaceum*); **9.** *Chromobacterium haemolyticum* CBMAI 1093^T. **61**

Figura 3. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Marmoricola* (**A**) e *Gordonia* (**B**) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **65**

Figura 4. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Williamsia* (**A**) e *Janibacter* (**B**) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **66**

Figura 5. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Kineococcus* (**A**), *Knoellia* (**B**) e *Serinicoccus* (**C**) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **67**

Figura 6. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Marmoricola* com base em sequências dos genes concatenados: **A.** *MLSA*: Genes

concatenados (16S_*rpoB_gyrB*); **B. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **69**

Figura 7. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Gordonia* com base em sequências dos genes concatenados: *MLSA:* Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **70**

Figura 8. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Williamsia* com base em sequências dos genes concatenados: **A. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA_gyrB*); **B. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA_gyrB_trpB*); **C. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoA_trpB*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **71**

Figura 9. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Janibacter* com base em sequências dos genes concatenados: **A. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB*); **B. MLSA:** Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. **72**

Figura 10. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Kineococcus* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA:* Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps*

1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. 73

Figura 11. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Knoellia* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoA_gyrB_recA_trpB*). Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. 73

Figura 12. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Serinicoccus* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA_gyrB_recA_trpB*). Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes conservados selecionados para análise de MLSA.	48
Tabela 2. Comparação das sequências do gene RNA ribossomal 16S dos isolados de actinomicetos com as linhagens Tipo do banco de dados Etaxon-e.	63
Tabela 3. T _m , conteúdo de %GC e T ₀ de renaturação dos isolados de actinomicetos.	76
Tabela 4. Hibridação DNA-DNA para os isolados B204, B375, B175 e B736, pelo método fluorimétrico.	78
Tabela 5. Crescimento e características fenotípicas dos isolados possíveis novas espécies de actinomicetos após incubação a 28 °C por 14 dias.	80
Tabela 6. Características fenotípicas e quimiotaxonômicas dos isolados de actinomicetos.	83
Tabela 7. Vírus e linhagens celulares utilizados no estudo.	106
Tabela 8. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos isolados de actinobactérias: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), em mg/mL, contra diferentes micro-organismos indicadores	110
Tabela 9. Avaliação da atividade antiviral por titulação das substâncias testes a CMNT de 50 µg/mL contra diferentes vírus	115
Tabela 10. Identificação da fase da replicação viral do vírus aMPV inibida pelos extratos dos isolados de actinomicetes frente a diferentes tipos de tratamento	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%GC: Conteúdo de bases G + C.

16S rRNA: Unidade 16S do gene RNA ribossomal.

AA: Ágar água.

aMPV: Metapneumovírus aviário.

ASW: Água do mar artificial.

atpD: APT sintase subunidade beta

BVDV: Vírus da diarreia viral bovina.

CBMAI: Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria.

CBM: Concentração bactericida mínima.

CG: Cromatografia gasosa.

CIM: Concentração inibitória mínima.

CMNT: Concentração máxima não tóxica.

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

CTAB: Brometo cetiltrimetil amônio.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dnaX: DNA polimerase haloenzima III

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados.

DPG: Difosfatidilglicerol.

DRM: Divisão de Recursos Microbianos.

ECP: Efeito citopático.

FCV: Calicivírus Felino.

GL: Glicolípídeo desconhecido.

GPY: Meio glicose, peptona e extrato de levedura.

gyrB: Gene da DNA girase subunidade beta.

HSV-1: Herpes vírus simplex do tipo 1.

infB: Fator de iniciação

MA: Marine ágar.

MgCl₂: Cloreto de magnésio.

NA: Ágar nutriente.

NaOH: Hidróxido de sódio.

MLSA: Multilocus Sequence Analysis.

PC: Fosfatidilcolina.

PCR: Reação de polimerase em cadeia.

PG: Fosfatidilglicerol

PI: Fosfatidilinositol.

PIDM: Fosfatidilinositol dimanose.

PL: Fosfolipídeo desconhecido.

PME: Fosfatidilmetiletanolamina.

qsp: Quantidade suficiente para.

rDNA: DNA ribossomal.

recA: Recombinação de DNA.

recN: Recombinação de DNA e proteína de reparo

rpoA: RNA polimerase subunidade alfa.

rpoB: RNA polimerase subunidade beta.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

SSC: Tampão citrato de sódio.

RT-PCR: Reação de polimerase em cadeia em tempo real.

TLC: Cromatografia em camada delgada.

T_m: Temperatura de “melting”.

T_{or}: Temperatura ótima.

trpB: Triptofano sintase subunidade beta.

thdF: tRNA modification GTPase

TSA: Ágar triptona de soja.

LISTA DE SÍMBOLOS

g: grama

h: hora

m: metro

M: molar

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mg/mL: miligrama por mililitro

mM: milimolar

N: normal

ng: nanograma

nm: nanômetro

pM: picomol

ppm: partes por milhão

rpm: rotações por minuto

μ: micro

μg: micrograma

μL: microlitro

μm: micrometro

μM: micromolar

U: unidade

V/cm: Volts por centímetro

°C: graus Celsius

Δ : delta

λ : lâmbida

1. INTRODUÇÃO

Os actinomicetos (ordem Actinomycetales) constituem um amplo grupo de micro-organismos, os quais têm sido descritos como grandes produtores de substâncias bioativas de alto valor econômico e biotecnológico.

A diversidade biológica no ambiente terrestre é vasta, entretanto, os oceanos representam o habitat cuja diversidade é considerada a maior do planeta. Esta grande diversidade pode ser explicada pelo fato dos organismos, macro e micro-organismos, terem que se adaptar a diferentes condições ambientais, tais como alta pressão atmosférica, temperaturas abaixo de 0 °C e limitação de oxigênio em regiões profundas ou temperaturas maiores de 100 °C e pH ácidos em aberturas hidrotérmicas nas cordilheiras dos oceanos. É de se esperar que os actinomicetos marinhos apresentem uma diversidade genética e metabólica que continua, em grande parte, desconhecida e diferente dos actinomicetos terrestres (BULL et al., 2005; FIEDLER et al., 2005; JENSEN et al., 2005a).

Historicamente, muitos esforços foram gastos na busca do isolamento de novos actinomicetos terrestres a partir de programas de *screening* de novas drogas nos últimos anos. Entretanto, a taxa de descoberta de novos compostos a partir de actinomicetos terrestres diminuiu, enquanto a taxa de re-isolamento de compostos conhecidos aumentou (FENICAL et al., 1999). Assim, é esperado que novos actinomicetos de habitat ainda não explorados ou pouco explorados, como o ambiente marinho, sejam fontes de novos metabólitos secundários bioativos (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; LAM et al., 2006). O cultivo destes novos actinomicetos pode contribuir para a compreensão das suas funções ecológicas e fornecer uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos. Assim, com intuito de acessar o potencial pouco explorado da microbiota marinha, o presente trabalho, através do isolamento e cultivo dos actinomicetos explorou o potencial biotecnológico dos extratos desses micro-organismos e através da taxonomia polifásica identificou novas espécies de actinomicetos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DIVERSIDADE MICROBIANA MARINHA

A diversidade biológica no ambiente terrestre é extraordinária, entretanto, os oceanos representam o habitat cuja diversidade é considerada a maior do planeta. Mais de 70% da superfície do planeta é coberta por oceanos e a vida na Terra originou-se no mar. Em alguns ecossistemas marinhos, tais como mar profundo, recifes de corais, sedimentos, invertebrados e plantas, estima-se que a diversidade biológica seja maior que nas florestas tropicais. Esta grande diversidade pode ser explicada pelo fato dos micro-organismos, entre eles, os actinomicetos marinhos terem que se adaptar a diferentes condições ambientais, tais como alta pressão atmosférica, temperaturas abaixo de 0 °C e limitação de oxigênio em regiões profundas ou temperaturas maiores de 100 °C e pH ácidos em aberturas hidrotérmicas nas cordilheiras dos oceanos e, portanto, é de se esperar que os actinomicetos marinhos apresentem uma diversidade genética e metabólica que continua em grande parte desconhecida e diferente dos actinomicetos terrestres (BULL et al., 2005; FIEDLER et al., 2005; JENSEN et al., 2005a).

O ambiente marinho tem mostrado grande abundância de bactérias, incluindo novas espécies de Alphaproteobacteria (MURAMATSU et al. 2007), Gammaproteobacteria (BRETTAR; CHRISTEN; HOFLE, 2002), Epsilonproteobacteria (CAMPBELL et al. 2001), e Actinobacteria (MALDONADO et al. 2005). Esses micro-organismos têm sido isolados de sedimentos marinhos, água do mar e associados a invertebrados marinhos. Horta et al. (2014) obtiveram 39 bactérias associadas à alga *Bifurcaria bifurcata* identificadas como *Vibrio* sp. (48,72%), *Alteromonas* sp. (12,82%), *Shewanella* sp. (12,26%), *Serratia* sp. (2,56%), *Citricoccus* sp. (2,56%), *Cellulophaga* sp. (2,56%), *Ruegeria* sp. (2,56%) e *Staphylococcus* sp. (2,56%). Outros estudos relatam a associação de bactérias a esponjas, nestes as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas*, grupos α -Proteobacteria (THAKUR; MÜLLER, 2004) e Actinobacteria (LI et al., 2009), são muito abundantes em esponjas.

Menezes et al. (2010) obtiveram uma grande diversidade de bactérias a partir de diversos organismos marinhos (algas, esponjas e ascídias), sendo encontradas bactérias relacionadas a 41 gêneros, distribuídos entre os Filos Proteobacteria (*Ruegeria*, *Aurantimonas*,

Brevundimonas, *Stappia*, *Nautella*, *Pseudovibrio*, *Acinetobacter*, *Endozoicomonas*, *Microbulbifer*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Vibrio* e *Stenotrophomonas*), Actinobacteria (*Knoellia*, *Nocardia*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Gordonia*, *Williamsia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Janibacter*, *Kineococcus*, *Nocardioides*, *Brevibacterium*, *Agrococcus*, *Saccharopolyspora* e *Brachybacterium*), Firmicutes (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Planomicrobium*, *Exiguobacterium*, *Lysinibacillus*, *Paucisalibacillus*, *Planomicrobium*, e *Terribacillus*) e Bacteroidetes (*Aquimarina* e *Dokdonia*). *Bacillus* foi o gênero mais abundante, seguido por *Ruegeria* e *Micrococcus*. Menezes et al. (2010) foram os primeiros a relatar o isolamento de espécies do gênero *Curtobacterium*, em ambiente marinho, antes apenas observados por metodologia independente de cultivo (GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007).

Lee et al. (2014) descreveram o isolamento *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Sinomonas*, *Nocardia*, *Terrabacter*, *Streptacidiphilus*, *Micromonospora*, *Gordonia* e *Nocardioides* de mangue, onde dos 87 isolados cinco foram considerados novas espécies. Ainda nove isolados de *Streptomyces* sp. produziram metabólitos secundários com potente atividade antimicrobiana.

Ulanova e Goo (2014) obtiveram 100 isolados de actinomicetos a partir de sedimento, isolados esses classificados entre os gêneros *Actinotalea*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Isopterocola*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*.

Durante algum tempo acreditou-se que os actinomicetos isolados em ambientes marinhos eram os actinomicetos terrestres cujos esporos resistentes foram transportados para os oceanos e permaneceram latentes neste ambiente (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000). Entretanto, provas da existência de actinomicetos marinhos indígenas vieram com a descrição de *Rhodococcus marinonascens*, a primeira espécie marinha de actinomiceto a ser caracterizada (HELMKE; WEYLAND, 1884) e relatos de descritos na literatura sobre adaptações específicas de alguns isolados marinhos (JENSEN; DWIGHT; FENICAL, 1991). Além disso, a atividade metabólica diferenciada observada em isolados de sedimentos marinhos corroboraram esta hipótese de espécies exclusivamente marinhas (MORAN; RUTHERFORD; HODSON, 1995).

Estudos utilizando estratégias dependentes de cultivo revelaram que os actinomicetos existem efetivamente nos oceanos e incluem membros dos gêneros: *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*,

Nocardia, *Micromonospora*, *Williamsia* e *Verrucosisspora*, encontrados também em ambiente terrestre (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; JENSEN et al., 2005a, 2005b; MAGARVEY et al., 2004; STACH et al., 2004). Mincer et al. (2002, 2005) descreveram o primeiro gênero de actinomicetos, *Salinospora*, obrigatoriamente marinho isolado de sedimento. Posteriormente, representantes deste gênero também foram isolados da esponja marinha *Pseudoceratina clavata* (KIM et al., 2005).

A diversidade de actinomicetos marinhos é vasta e única conforme revelado por estudos utilizando metodologia independente de cultivo tanto de sedimento (MALDONADO et al., 2005) quanto de esponjas marinhas (HILL, 2004). As esponjas podem ser importantes fontes de diversos actinomicetos, uma vez que estes são os principais micro-organismos associados a estes poríferos (XI; RUAN; HUANG, 2012; SUN et al., 2010). Já em corais, a abundância de actinobactérias é variável, de 10 a 50 % do total de bactérias associadas a este cnidário (LAMPERT et al., 2008), enquanto estima-se que 34 gêneros dentro de 16 famílias da ordem Actinomycetales, são associadas a ascídias (XI; RUAN; HUANG, 2012). O cultivo destes novos actinomicetos pode contribuir para a compreensão das suas funções ecológicas e fornecer uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos.

2.2. ACTINOBACTÉRIA

A classe *Actinobacteria* compreende bactérias saprófitas, Gram-positivas com alto conteúdo de GC e inclui os actinomicetos (ordem *Actinomycetales*) cujos membros constituem um grupo amplo de micro-organismos, os quais têm sido descritos como grandes produtores de substâncias bioativas de alto valor econômico e biotecnológico, com aplicações no campo da indústria, agricultura e farmacêutico. Eles são responsáveis pela produção de cerca da metade das descobertas de metabólitos secundários bioativos, tais como antibióticos, agentes antitumorais, imunossupressores, antifúngicos, antimaláricos, anti-inflamatórios, enzimas (BALTZ, 2005, 2007; BERDY, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2005; JENSEN et al. 2005b; MANIVASAGAN et al., 2013).

As actinobactérias estão amplamente distribuídas em vários habitats, desde o ambiente marinho (oceano, sedimentos, macro-organismos e organismos marinhos), o habitat de água doce até o terrestre (solo, plantas, insetos, matéria orgânica). Em ambientes aquáticos, as actinobactérias taxonomicamente diversificadas apresentam características fisiológicas e

estruturais únicas que lhes permitem sobreviver em condições extremas de pressão, salinidade e temperatura, com o aumento do potencial de produção de metabólitos secundários, não observados em actinomicetes, isolados de habitats terrestres. Os invertebrados marinhos, tais como esponjas e corais podem ser considerados pequenos ecossistemas em que diferentes espécies de micro-organismos competem entre si por recursos muitas vezes escassos. Essa relação simbiótica ou comensal entre micro-organismos e hospedeiros origina metabólitos secundários cujas ações podem ser exploradas biotecnologicamente.

2.3.METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS

Os produtos naturais sempre tiveram um importante papel na descoberta de fármacos (CARTER, 2011). Dos fármacos disponíveis, 60% foram derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Nos últimos anos o interesse em acessar a biodiversidade microbiana levou à descoberta de inúmeros micro-organismos e dos produtos derivados de seu metabolismo (metabólitos secundários) nos mais variados habitats. Dentre os micro-organismos, as bactérias têm mostrado ser uma fonte rica de produtos naturais, com um número restrito de taxa abrangendo a grande maioria dos compostos descobertos (KONIG et al. 2006; BRADY, 2009). Entre estes micro-organismos, a Classe *Actinobacteria*, e, mais especificamente, bactérias pertencendo à Ordem *Actinomycetales* (actinomicetos) contribuem com mais da metade dos compostos bioativos constantes no banco de dados de literatura de antibióticos “Antibiotic Literature Database”. Grande parte desses produtos bioativos é produzida por actinomicetos isolados de solo, principalmente do gênero *Streptomyces*, onde está descrito o maior número de espécies do grupo e são responsáveis por 80% dos produtos naturais derivados dos actinomicetos (BULL; STACH, 2007). No entanto, a maioria dos *Streptomyces* foi isolada do ambiente terrestre, enquanto aqueles originários de fontes marinhas permanecem ainda pouco explorados.

Os metabólitos secundários de origem marinha ganharam significativa importância pelo fato de apresentarem potentes atividades biológicas bem como características únicas (BLUNT et al., 2005; JENSEN et al., 2005a; LI, 2009). É estimado que 58 % dos produtos naturais são derivados de actinobactérias associadas a esponjas marinhas, além das

associações com mangues, algas, corais, ascídias, sedimentos, peixes e moluscos. Esses produtos naturais foram isolados, em sua maioria, a partir dos gêneros pertencentes a *Streptomyces*, seguidos por *Micronospora*, *Nocardiosis*, seguidos de *Salinospora*, *actinomadura*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Saccharothrix*, *Saccharopolyspora* e *Verrucosipora* (VALLIAPPAN; SUN; LI, 2014). Esses compostos bioativos possuem, em sua maioria, atividades citotóxicas, antimicrobiana, antiparasitária, neurológica, antioxidante, anti-HIV, imunossupressivas, inibidores de enzimas, enzimas, pigmentos (DHARMARAJ, 2010). Tais compostos bioativos possuem, em sua maioria, atividades citotóxicas, antimicrobiana, antiparasitária, neurológica, antioxidante, anti-HIV, imunossupressivas, inibidores de enzimas, enzimas, pigmentos (KONIG et al. 2006; DHARMARAJ e SUMANTHA 2009; EL-SHATOURY et al. 2009; ABDELMOHSEN et al. 2010; DHARMARAJ, 2010; WEBSTER; TAYLOR, 2012; WU et al. 2012; ZOTCHEV, 2012; JIMENEZ et al. 2013; LI et al. 2013; YANG et al. 2013; ABDELMOHSEN et al. 2014).

Em geral, os principais efeitos de metabólitos secundários são a defesa, regulação e comunicação. Além disso, a sua composição química e funções fisiológicas são diversas. Eles podem funcionar como vitaminas, cofatores, hormônios, feromônios, fragrância, neurotransmissores, corantes, toxinas, antineoplásicos, agentes farmacologicamente ativos e antibióticos. Além disso, suas funções biológica-celular inerente são extremamente diversificadas. Por exemplo, eles podem modular a transcrição celular, multiplicação, a transferência de genes, a indução de fagos, a resposta da célula hospedeira actividade, inter e sinalização intracelular, e induzir a resistência e virulência (BERDY, 2012).

A busca por novos antibióticos é contínua considerando a rápida disseminação de patógenos resistentes aos antibióticos, com diminuição da eficácia dos medicamentos e ao aumento das infecções fúngicas e bacterianas (RAVIKUMAR et al., 2010; 2012). Embora tenha havido progressos consideráveis nos domínios da síntese química e engenharia de biossíntese de compostos antimicrobianos, a natureza é ainda considerada a fonte mais rica e mais versátil para novos antibióticos (BREDHOLT et al., 2008). Sendo assim, a biodiversidade marinha constitui uma fonte praticamente ilimitada de produtos naturais biologicamente ativos com potencial de aplicação em diversas áreas da saúde humana e animal, como ferramentas bioquímicas e ainda na indústria agroquímica.

Micro-organismos são um dos maiores reservatórios de compostos naturais potencialmente ativos, tais como policetídeos (PKS, do inglês *polyketide synthases*),

peptídeos não ribossomais (NRPS, do inglês *non-ribosomal peptide synthetase*) e alcalóides (GINOLHAC et al., 2004). PKSs e NRPSs são enzimas multifuncionais de alto peso molecular (200-2,000 kDa) as quais possuem uma organização modular dos genes que as codificam, contendo regiões de sequência altamente conservada (ZHAO et al., 2008). Estes são alvos de pesquisa de novos metabólitos secundários microbianos biologicamente ativos, a fim de satisfazer a crescente procura por novos antibióticos. Neste sentido, a bioprospecção de novos compostos bioativos naturais tem como foco a detecção de novos PKSs e NRPSs, os quais são sintetizados por bactérias, fungos e plantas (MOFFITT; NEILAN, 2003). A síntese de PKSs e NRPSs resulta numa diversidade de compostos biologicamente ativos, incluindo antibióticos (oxitetraciclina, pradimicina), antitumorais (doxorubicina), antiparasitários (frenolicina), toxinas, sideróforos, e imunossupressores (CROSA; WALSH, 2002). O reconhecimento da diversidade das PKS e NRPS no ambiente é importante para a descoberta de futuras drogas e biossínteses combinatórias (ZHAO et al., 2008).

Actinomicetos, bacilos e fungos são conhecidos por produzirem metabólitos secundários não-ribossômicos, com sua biossíntese bem caracterizada. No passado, estes micro-organismos foram de grande interesse devido à produção de antibióticos não-ribossômicos, tais como actinomicina, gramicidina S e ciclosporina (imunossupressora) produzidos pelo fungo *Tolypocladium niveum* (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1990).

O complexo NRPS descoberto em *Actinomyces* inclui os envolvidos na biossíntese dos antibióticos ansatrienina (CHEN et al., 1999) e os do grupo vancomicina, cloroeremomicina (VAN WAGENINGEN et al., 1998), bleomicina (SHEN et al., 1999) e estreptomina (FERNANDEZ et al., 1997). O biosurfactante fengicina, que exibe atividade antimicrobiana e antiviral, é produzido via um mecanismo de arranjo de tióis em *Bacillus subtilis* (STELLER et al., 1999). Biossíntese não-ribossômica de agentes antifúngicos micosubtilina tem sido estudado nestas espécies (DUITMAN et al., 1999). *Pseudomonas* produz um sideróforo que consiste no fator de virulência, pioquelina (QUADRI et al., 1999) e a fitotoxina siringomicina (ZHANG et al., 1995) via um mecanismo de arranjo de tióis. O gene responsável pela biossíntese do fator de virulência yersiniabactina e micobactina de *Yersinia pestis* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente, foi completamente sequenciado e a via biossintética foi proposta (GEHRING et al., 1998; QUADRI et al., 1998). A via não-ribossômica tem sido implicada na biossíntese do biosurfactante serrawetina, de *Serratia*

liquefaciens (LINDUM et al., 1998). Peptídeos não-ribossômicos foram também identificados em *Myxobacteria*, incluindo o inibidor de transporte de elétrons myxothiazol produzido por *Stigmatella aurantiaca* (SILAKOWSKI et al., 1999) e antibiótico TA de *Myxococcus xanthus* (PAITAN et al., 1999).

Anteriormente à descoberta de antibióticos produzidos por micro-organismos, as plantas terrestres apresentavam um grande impacto no descobrimento de drogas a partir de fontes naturais (PROKSCH et al. 2003). O processo de procura por novas drogas produzidas por fungos filamentosos foi desencadeado após a descoberta do antibiótico penicilina (FLEMING, 1929) e do imunossupressor ciclosporina, o que causou grande impacto na história dos produtos derivados de fungos com potencial utilização na área médica. Os compostos antimicrobianos são substâncias produzidas por diversas espécies de micro-organismos e que impedem o crescimento de outros micro-organismos, podendo eventualmente destruí-los. Eles diferem acentuadamente nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação.

Infecções hospitalares constituem atualmente um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Anualmente são identificadas novas linhagens de bactérias resistentes a antibióticos potentes, como as mais novas classes de penicilinas, cefalosporinas, oxacilina e até mesmo vancomicina, considerando um dos antibióticos mais potentes. Tais bactérias altamente patogênicas foram detectadas inclusive em hospitais brasileiros, incluindo linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. e diferentes linhagens de *Enterococcus*. Sendo assim, fica clara a importância, não somente do alerta ao surgimento de bactérias cada vez mais resistentes a antibióticos, bem como da descoberta de novas estruturas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra micro-organismos resistentes (LANGTON; HENDERSON; HERBERT, 2005).

Metabólitos secundários foram isolados de actinomicetos marinhos sendo as atividades antibacteriana e anticâncer as principais atividades biológicas descritas (LAM, 2006). Poucos estudos envolvendo actinomicetos e metabólitos secundários abordam a atividade antiviral, entretanto, esta atividade não é menos importante que as demais, sobretudo do ponto de vista de saúde animal.

Novos vírus de interesse veterinário e de saúde pública foram surgindo e muitos outros apresentando caráter re-emergente. Muitas drogas foram aprovadas para o tratamento de

infecções virais, a maioria delas é resultado da síntese de substâncias análogas aos nucleotídeos, facilitando o desenvolvimento de resistência a estas drogas (CHIANG et al., 2002). Além do mais, a resistência viral contra aciclovir representa um problema crescente na terapia das doenças produzidas por herpes simplex, inclusive em pacientes imunodeprimidos (NOLKEMPER et al., 2006). Por este motivo, atualmente o interesse na pesquisa para a descoberta de novos antivirais mais eficazes e com menos efeitos adversos vêm aumentando

Compostos com ação antiviral isolados de plantas, utilizados na medicina tradicional, incluído polissacarídeos, flavoníodes, terpenos, alcalóides, fenóis e aminoácidos, foram relatados. A triagem de plantas selecionadas através da etnobotânica tem se mostrado eficiente (COS, et al., 2006). Entretanto, a produção de metabólitos secundários a partir de plantas está limitada a área de plantio, tempo de crescimento, controle de pragas, entre outros.

Metabólitos quimicamente únicos com elevada atividade citotóxica e anticâncer também foram isolados a partir de invertebrados marinhos, como moluscos, tunicados, briozoários e esponjas, e introduzidos para ensaios pré-clínicos (SALOMON; MAGARVEY; SHERMAN, 2004). No entanto, a disponibilidade destes animais no ambiente é limitada e sua captura pode comprometer o ecossistema marinho, além disso, a criação em sistema de contenção nem sempre foi estabelecida.

Em contraste com plantas e invertebrados marinhos as bactérias parecem ser uma fonte promissora como produtores de novos compostos. A droga anticâncer, *thiocoraline*, produzida pela bactéria marinha *Micromonospora* (ROMERO et al. 1997) e o medicamento antiviral, *cyclomarin*, produzido por uma linhagem de *Streptomyces* isolado de ambiente marinho (RENNER et al. 1999), são exemplos de compostos obtidos a partir de micro-organismos de ambiente marinho. Ainda, o aumento das pesquisas em relação às actinobactérias, devido a grande diversidade de compostos com potencial farmacológico, pertencentes a classes estruturais, tais como, policetpideos, isoprenóides, fenazinas, peptídeos, indolcarbozol e esteróis. Ainda, a fermentação de micro-organismos permite maior rendimento e produção dos metabólitos secundários bioativos (BULL; STACH, 2007; FENICAL; JENSEN, 2006; LAM, 2006; LANE; MOORE, 2011; NEWMAN; HILL, 2006; ZOTCHEV, 2012).

2.4. TAXONOMIA POLIFÁSICA

A taxonomia dos actinomicetos é bastante complexa, começando pela morfologia da colônia que dependendo do *taxon* pode se apresentar como cocos ou bastonetes filamentosos ou, como um micélio estável constituído de filamentos ramificados ou hifas, além disso, podem apresentar esporos móveis ou imóveis (LECHEVALIER, 1994). Esta riqueza de formas foi usada inicialmente para justificar a separação do grupo actinomicetos de micro-organismos morfologicamente simples dentro do domínio Bactéria (EMBLEY E STACKEBRANT, 1994).

Segundo Vandamme e colaboradores (1996), a integração de diferentes informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas, conhecida como classificação polifásica, permitem uma definição mais coerente dos grupos taxonômicos em bacteriologia. A aplicação da taxonomia polifásica tem gerado alterações na sistemática bacteriana, especialmente no que diz respeito a grupos de importância industrial, como os actinomicetos, para os quais a taxonomia tradicional baseada na forma e bioquímica dos micro-organismos apresenta grandes limitações (GOODFELLOW; O'DONNELL, 1994). Em 1997, STACKEBRANDT et al., (1997) propuseram uma nova estrutura de classificação para os actinomicetos, baseando-se na análise do operon ribossomal, com a proposta da Classe Actinobacteria. Assim, os actinomicetos estão taxonomicamente classificados dentro do domínio Bactéria, na divisão Actinobacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales (GARRITY; BELL; LILBURN, 2003).

A identificação dos actinomicetos em nível de gênero requer a caracterização da micromorfologia e de componentes químicos de parede e membrana. As estruturas morfológicas utilizadas para diferenciar gêneros são: presença de micélio aéreo e/ou micélio vegetativo; formação de conídios isolados, aos pares, em cadeias curtas ou longas; presença de esporângios contendo esporos móveis ou não; formação de esporângio multilocular; presença de esclerócio (LECHEVALIER, 1989). Por outro lado, a análise química de marcadores celulares, tais como, a determinação dos aminoácidos presentes nas pontes peptídicas da cadeia do peptidoglicano e açúcares no hidrolisado celular são as características mais utilizadas com fins taxonômicos. Ainda, a análise filogenética de sequências do *operon* ribossomal pode ser empregada para identificação de actinomicetos em nível de gênero e, em alguns casos, de espécie (GOODFELLOW; O'DONNELL, 1994).

Considerando que o *operon* ribossomal representa apenas uma pequena porção do genoma e sua taxa evolutiva é lenta, estes dois fatores podem comprometer tanto a diferenciação de linhagens proximamente relacionadas como a resolução das árvores filogenéticas. Este fato é observado para muitos grupos de micro-organismos, entre eles, para os actinomicetos. As limitações do uso do *operon* ribossomal e o fato de que hibridação DNA-DNA é uma técnica trabalhosa, levaram a uma busca de marcadores filogenéticos alternativos. Recentemente, análises combinadas de vários genes *housekeeping*, originária da estratégia denominada *Multilocus Sequence Typing* (MLST), têm sido utilizadas com sucesso na sistemática microbiana para elucidar as relações taxonômicas entre as espécies (CHRISTENSEN et al., 2004; RIVAS et al., 2009).

MLST consiste na escolha de um conjunto de genes homólogos, identificados através de genômica comparativa de dados de sequências originados de genomas bacterianos disponíveis para acesso público e avaliação do potencial destes marcadores na identificação e classificação de micro-organismos (MAIDEN et al., 1998). MLST foi proposto em 1998 como uma ferramenta versátil e um método definitivo para caracterização de bactérias. Dados de MLST têm sido empregados em investigações epidemiológicas em várias escalas e em estudos de biologia populacional, patogenicidade e evolução de bactérias, principalmente de patógenos humanos (MAIDEN, 2006).

MLST é um método de tipagem genérico para caracterização de isolados bacterianos em nível molecular. A abordagem moderna da técnica consiste no sequenciamento e análise de fragmentos de 5 a 7 genes conservados (geralmente *housekeeping*), espaçados ao longo do genoma bacteriano com pelo menos 100 Kb de distância um do outro. A vantagem no uso desta estratégia refere-se ao fato das diferenças entre as linhagens estarem indexadas diretamente nas sequências de DNA, as quais podem ser disponibilizadas em bancos de dados de domínio público e comparadas com facilidade. O método MLST diferencia as espécies em nível intra e interespecífico e amplia a visão sobre a biodiversidade e evolução de bactérias (MAIDEN, 2006; MAIDEN et al., 1998).

A partir da técnica de MLST surgiram variações do método como o MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) que é usado para definição genotípica de espécies. No MLST as sequências tipos são consideradas diferentes quando um ou mais nucleotídeos diferem entre duas sequências, e as sequências tipos são numeradas arbitrariamente independentemente do número de diferenças dos nucleotídeos. No MLSA as sequências são comparadas por

similaridade e as análises filogenéticas são feitas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Assim, MLSA é mais adequado para separação de espécies enquanto MLST é mais apropriado para estudo de diversidade (CHRISTENSEN et al., 2007).

Um fator limitante nas técnicas MLST e MLSA é a escolha dos genes a serem estudados. Estudos recentes baseados em genomas completos têm fornecido a base para o estabelecimento de conjuntos de genes úteis para MLSA em um grande número de linhagens bacterianas. Os genes a serem utilizados para diferenciação de espécies devem estar presentes em cópia única e amplamente distribuídos entre os genomas bacterianos, e genes nos quais recombinação pode conferir uma vantagem seletiva ou genes estreitamente ligados devem ser evitados. De fato, ainda não estão definidos os conjuntos de genes que poderiam ser utilizados em todos os níveis filogenéticos. Entretanto, um estudo envolvendo 49 genomas bacterianos de diferentes filos buscando selecionar genes informativos para filogenia e identificação encontrou alta correlação entre a similaridade dos genes *recA*, *thdF*, *rpoA*, *dnaX* e as sequências totais dos genomas. Sendo assim, as sequências de tais genes podem ser utilizadas para identificação em nível de espécies numa abordagem multilocus (ZEIGLER, 2003).

Recentemente, a análise de genes *housekeeping* tem se mostrado útil para a classificação, identificação e diferenciação de espécies estreitamente relacionadas com sequências de genes 16S gene RNA ribossomal quase idênticas, além de um eficiente método de seleção para delimitação de novos táxons (NASER et al., 2005).

MLSA tem sido amplamente empregado para estudos taxonômicos, bem como para elucidação de processos microevolucionários de determinadas espécies e determinação de distribuição geográfica para o gênero *Bradyrhizobium*, cujo gene RNA ribossomal é altamente conservado entre as espécies (RIVAS et al., 2009; VINUESA et al., 2008). Rivas et al. (2009) encontraram valores de hibridação que foram coerentes refletidos na filogenia dos cinco genes concatenados analisados, revelando a aplicação de MLSA para classificação e identificação de espécies, como já descritos para vários outros grupos de rizóbios (MARTENS et al., 2008; VINUESA et al., 2008).

A técnica de MLSA tem sido utilizada também para identificação e classificação de espécies e como marcadores filogenéticos na família *Enterobacteriaceae*. Brady et al. (2008) revelaram que os genes *housekeeping gyrB*, *rpoB*, *atpD* e *infB*, foram confiáveis marcadores genéticos para a diferenciação de espécies de *Pantoea*. MLSA não só distinguiu entre as

sete espécies de *Pantoea* validamente publicadas, como também sugeriu potencial existência de dez novas espécies.

Norskov-Lauritsen et al. (2005) descreveram uma nova espécie *Haemophilus pittmaniae* a partir da comparação de quatro genes por MLSA, confirmando resultados obtidos por hibridação DNA-DNA. Genes esses selecionados a partir do estudo de MLST de *Haemophilus influenzae* (MEATS et al., 2003).

Kuhnert e Korczak (2006) propuseram, baseado no trabalho de Zeigler (2003), que a comparação da sequência de genes (*recN*, *rpoA* e *thdF*) poderia substituir a análise de hibridação DNA-DNA e, além disso, mostraram que o sequenciamento de um único gene poderia servir para esse propósito. Estudos adicionais são necessários para conclusão final da possibilidade da substituição da hibridação DNA-DNA por esse método, uma vez que a hibridação DNA-DNA é um experimento obrigatório para a classificação de uma nova espécie quando a divergência apresentada pelo gene RNA ribossomal 16S é baixa.

Poucos estudos de MLSA se aplicam aos actinomicetos, Stackebrandt, Brambilla e Richert (2007) avaliaram sequências parciais de genes *housekeeping* para o gênero *Microbacterium* e demonstraram a necessidade de utilização de mais genes para chegar uma melhor relação filogenética comparada ao gene RNA ribossomal 16S. Enquanto que para o gênero *Streptomyces*, o MLSA tem se mostrado promissor na sistemática deste gênero (GUO et al., 2008; RONG; HUANG, 2010). Rong e Huang (2010) demonstraram que a análise de cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*) apresentou boa resolução e robustez para a diferenciação de *Streptomyces griseus*, além de apresentar forte correlação com dados de hibridação DNA-DNA, podendo ser uma ferramenta alternativa a hibridação DNA-DNA para identificação e classificação de espécies de *Streptomyces* em nível de espécies e intra-espécies. Baseado em dados de MLSA, hibridação DNA-DNA e características morfológicas 18 espécies e 3 sub-espécies de *S. griseus* foram reclassificadas em outras espécies genômicas.

Neste contexto, a metodologia de MLSA pode ser uma ferramenta importante na caracterização e diferenciação de actinomicetos, assim como para o estabelecimento de níveis de corte de similaridades de sequências nos diferentes marcadores para delimitação de espécies e proposição de novas espécies.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmohsen, U.R., Pimentel-Elardo, S.M, Hanora, A., Radwan, M., Abou-El-Ela, S.H., Ahmed, S., Hentschel, U. (2010). Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge associated actinomycetes. *Mar Drugs*, 8:399–412.
- Abdelmohsen, U.R., Bayer, K., Hentschel, U. (2014) Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Nat Prod Rep*, 31:381–399.
- Baltz, R.H. (2007). Antimicrobials from Actinomycetes: back to the future. *Microbe*, 2:125–131.
- Baltz, R. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall. *SIM News*; 55(5):186–196.
- Berdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites, a personal view. *J Antibiotics*, 58: 1-26.
- Berdy J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65: 385–395.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2005) Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 22: 15-61.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T. (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 447–460.
- Brady, S.F., Simmons, L., Kima, J.H., Schmidt, E.W. (2009) Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat Prod Rep* 26:1488–1503.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., Zotchev, S. B. (2008) Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: diversity and biological activity. *Mar Drugs*, 6: 1124 pp.
- Brettar, I., Christen, R., Hofle, M. G. (2002) *Rheinheimera baltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1851–1857.
- Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:573-606.
- Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 65-79.
- Bull, A.T.; Stach, J.E.M. (2007) Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol*, 15: 491-499.
- Campbell, B.J., Christian, J., Kostka, J. E., Luther, G.W., Cary, S.C. (2001) Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the Epsilon subdivision of the Proteobacteria enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4566–4572.
- Carter, G.T. (2011) Natural products and pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Nat Prod Rep* 28:1783–1789.
- Chen, S. et al. (1999) Biosynthesis of an satrienin (mycotrienin) and naphthomycin—Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tü 1892. *Eur. J. Biochem*, 261: 98-107.

- Chiang, L.C., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, L.T., Lin, C.C. (2002) Antiviral activity of *Plantago* major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res*, 55(1):53-62.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E., Bisgaard, M., (2004) Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 1601–1609.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Busse, H. J., Frederiksen, W. C., Bisgaard, M. (2007) Proposed minimal standards for the description of genera species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 166-178.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V. E., Maes, L. (2006) Antiinfective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3): 290-302.
- Cragg, G. M., Newman D. J. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2): 72-79.
- Crosa, J.H., Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2): 223-249.
- Demain, A.L., Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot*, 62(1): 5–16.
- Dharmaraj, S. (2010) Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol*, 26(12): 2123–2139.
- Dharmaraj, S., Sumantha, A. (2009) Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1971–1979.
- El-Shatoury, S.A., El-Shenawy, N.S., Abd El-Salam, I.M. (2009) Antimicrobial, antitumour and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. *World J Microbiol Biotechnol*, 25:1547–1555.
- Embley, T. M., Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 48: 257-289.
- Fenical, W., Baden, D., Burg, M., de Goyet, C. V., Grimes, J. D., Katz, M., Marcus, N. H., Pomponi, S., Rhines, P. Tester, P., Vena, J: Marine-derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. In *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health* (Edited by Fenical, W.), National Academies Press, 1999, pp. 71-86.
- Fenical, W., Jensen, P.R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat ChemBiol* 2: 666–673.
- Fiedler, H.P, Bruntner, C., Bull, A.T, Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihim, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87 (1): 37-42.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10: 226-236.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. Taxonomic Outline Of The Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 Ed. New York: Springer-Verlag, 2003.
- Gehring, A.M., Perry, R.D. (1998) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of *Yersinia bactin* by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* 5: 573-586.

- Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T. M., Perriere, G., Simonet, P., Nalin, R. (2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5522–5527.
- Gontang, E. A., Fenical, W., Jensen, P. R. (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 73(10): 3272–3282.
- Goodfellow, M.; O'donnell, A. G. Chemosystematics: current state and future prospects. In: Goodfellow, M.; O'donnell, A. G. (Ed.). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y. (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J Syst Evol Microbiol*, 58: 149–159.
- Helmke, E., Weyland, H. (1984) *Rhodococcus marinonascens* sp. Nov., an actinomycete from the sea. *Int J Syst Bacteriol*, 34:127-138.
- Hill, R. T. Microbes from marine sponges: a trove of biodiversity of natural products discovery. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. (Edited by Bull AT). *ASM Press*; 2004: 177-190.
- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., Fino, N., Silva, J., Fernandez, S., Rodrigues, A., Pedrosa, R. (2014) Antioxidant and Antimicrobial Potential of the *Bifurcaria bifurcata* Epiphytic Bacteria. *Mar Drugs*, 12: 1677.
- Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. (1991) Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57:1102-1108.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J., Fenical, W. (2005a) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*, 7:1039-1048.
- Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. (2005b) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 43-48.
- Jimenez, P.C., Ferreira, E.G., Araújo, L.A., Guimarães, L.A., Sousa, T.S., Pessoa, O.D.L., Lotufo, T.M.C., Costa-Lotufo, L.V. (2013) Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vancouverense* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. *Lat Am J Aquat Res* 41:335–343.
- Kim, T.K., Mary, J., Garson, M.J., Fuerst, J.A. (2005) Marine actinomycetes related to the *Salinospora* group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Env Microbiol*, 7:509–518.
- Kleinkauf, H., von Döhren, H. (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem*, 192(1): 1–15.
- Konig, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A., Muller, D. (2006) Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chem BioChem* 7:229–238.
- Kuhnert, P., Korczak, B. M. (2006) Prediction of whole-genome DNA–DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology*, 152: 2537–2548.
- Lam, K.S. (2006) Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 245–251.

- Lampert, Y., Kelman, D., Nitzan, Y., Dubinsky, Z., Behar, A., Hill, R.T. (2008) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. *FEMS Microbiol Ecol*, 64:187–198.
- Langton, K.P., Henderson, P.J.F., Herbert, R.B. (2005) Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat. Prod. Rep.* 22: 439-451.
- Lane, A.L., Moore, B.S. (2011) A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. *Nat Prod Rep*, 28:411–428.
- Lee, L-H., Zainal, N., Azman, A-S., Eng, S-K., Goh, B-H., Yin, W-F., AbMutalib, N-S, Chan, K-G. (2014) Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *Sci World J*, 14 pp.
- Lechevalier, H.A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 2344-2347.
- Lechevalier, H.A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Holt, G. H et al., eds. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 611-623.
- Li, Z. (2009) Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. *Mar. Drugs*, 7: 113–129.
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., Givskov, M. (1998) N-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. of Bacteriology*, 180 (23): 6384–6388.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D.H. (2004) Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol*, 70: 7520-7529.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3140-3145.
- Maiden, M. C. J. (2006) Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60: 561-588.
- Maldonado, L. A., Stach, J. E. M., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. (2005) Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 11-18.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.-K. (2013) Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res*, 168, 311–332.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., DeVos, P., Willems, A. (2008) Advantages of MultiLocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 58: 200–214.
- Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J., Goldstein, R., Kroll, J. S., Popovic, T., Spratt, B. G. (2003) Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1623–1636.

- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., Berlinck, R. G. S., Sette, L. D. (2010) Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res*, 165(6): 466-82.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol*, 68: 5005-5011.
- Mincer, T. J., Fenical, W., Jensen, P. R. (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol*, 71: 7019-7028.
- Moran, M. A., Rutherford, L. T., Hodson, R.E. (1995) Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. , 61: 3695.
- Moffitt, M. C., Neilan B. A. (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J. Mol. Evol.*, 56: 446–457.
- Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K., Nakagawa, Y. (2007) *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the Alphaproteobacteria isolated in Japan and Palau. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 1304–9.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151: 2141–2150.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 70:461–477.
- Newman, D.J., Hill, R.T. (2006) New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33:539–544.
- Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Carle, R., Schnitzler, P. (2006) Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae Family against *Herpes simplex* virus Type 1 and Type 2 *in vitro*. *Planta Med*, 72: 1378-1382.
- Nørskov-Lauritsen, N., Bruun, B., Kilian, M. (2005) Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 1):449-56.
- Paitan, Y., Alon, G., Orr, E., Ron, E.Z., Rosenberg, E. (1999) The *ϕrst* gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J. Mol. Biol.*, 286: 465-474.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. A., Schupp, P., Lin, W H., Sudarsono, Wray, V., Steube, K. (2003) Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge- derived fungi. *Pure Appl. Chem*, 75: 343-352
- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., Walsh, C.T. (1998) Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol*, 5(11):631-645.
- Quadri, L. E. N., Keating, T. A., Patel, H. M., Walsh, C. T. (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Nonribosomal Peptide Siderophore Pyochelin: In Vitro Reconstitution of Aryl-4,2-bisthiazoline Synthetase Activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, 38: 14941-14954.

- Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob Inbaneson, S., Vinodkumar, T. (2010) Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens. *J Environ Biol*, 31(3):387–389.
- Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Saravanan, A., Monisha, N., Brindha, V., Muthumari, S. (2012) Antagonistic properties of seagrass associated *Streptomyces* sp., RAUACT-1: a source for anthraquinone rich compound. *Asian Pacific J Tropical Med*, 5(11):887–890.
- Renner, M. K., Shen, Y. -C., Cheng, X. -C., Jensen, P. R., Frank-moelle, W., Kauffman, C. A., Fenical, W., Lobkovsky, E., Clardy, J. (1999) Cyclomarins A-C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 11273–11276.
- Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 101–110.
- Romero, F., Espliego, F., Baz, J. P., de Quesada, T. G., Gravalos, D., la Calle, F., Fernandez-Puentes, J. L. (1997) Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.*, 50: 734–737.
- Rong, X., Huang, Y. (2010) Taxonomic evaluation of *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to reduce 29 species and subspecies to 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 696–703.
- Salomon, C. E., Magarvey, N. A., Sherman, D. H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep*, 21: 105 – 121.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. (1999) Bleomycin biosynthesis in *Streptomyces verticillus* ATCC15003: a model of hybrid peptide and polyketide biosynthesis. *Bioorg. Chem.*, 27: 155-171.
- Silakowski, B., Muller, R. (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.*, 274: 37391-37399.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. (2004) *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 191-194.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 479–491.
- Stackebrandt, E., Brambilla, E., Richert, K. (2007) Gene Sequence Phylogenies of the Family Microbacteriaceae. *Current Microbiol*, 55: 42-46.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P., Vaterl, J. (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and AI /3. *Chemistry & Biology*, 6(1): 31-41.
- Sun, W., Dai, S.K., Jiang, S.M., Wang, G.H., Liu, G.H., Wu, H.B., Li, X. (2010) Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98:65–75.

- Thakur, N. L., Müller, W. E. G. (2004) Biotechnological potential of marine sponges. *Curr. Sci.*, 86:1506–1512.
- Ulanova, D., Goo, K-S. (2015) Diversity of actinomycetes isolated from subseafloor sediments after prolonged low-temperature storage. *Folia Microbiologica*, 60 (3): 211-216.
- Valliappan, K., Sun, W., Li, Z. (2014) Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(17):7365-7377.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60: 407-438.
- Vinuesa, P., Rojas-Jimenez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S. K., NandanPrasad, B., Moe, H., Babu Selvaraju, S., Thierfelder, H., Werner, D. (2008) Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environm. Microbiol*, 74: 6987–6996.
- Xi, L., Ruan, J., Huang, Y. (2012) Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the China seas. *Int J Mol Sci*, 13:5917–5932.
- Webster, N.S., Taylor, M.W. (2012) Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ Microbiol* 14: 335–346
- Wu, H., Chen, W., Wang, G., Dai, S., Zhou, D., Zhao, H., Guo, Y., Ouyang, Y., Li, X. (2012) Culture-dependent diversity of Actinobacteria associated with seagrass (*Thalassia hemprichii*). *Afr J Microbiol Res* 6:87–94.
- Yang, S., Sun, W., Tang, C., Jin, L., Zhang, F., Li, Z. (2013) Phylogenetic diversity of actinobacteria associated with soft coral *Alcyonium gracllimum* and stony coral *Tubastraea coccinea* in the East China Sea. *Microb Ecol*, 66:189–199.
- Zeigler, D. R. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 53: 1893-1900.
- Zhang, M., Zhao, X., Li, H., Lu, S. (1995) Cloning and expression of the gene coding for IL-2(60)-PE40, a molecular targeted protein. *Chin Med Sci J*, 10(3):136-140.
- Zhao, Q., He, Q., Ding, W., Tang, M., Kang, Q., Yu, Y., Deng, W., Zhang, Q., Fang, J., Tang, G., Liu, W. (2008) Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 15: 693–705.
- Zotchev, S.B. (2012) Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol*, 158:168–175.

3. OBJETIVOS

A presente proposta tem como objetivo principal a caracterização taxonômica de actinomicetos associados a sedimento e a macro-organismos marinhos (esponjas, ascídias, nudibrânquios, estrelas-do-mar e algas), coletados no litoral norte do estado de São Paulo, utilizando uma abordagem polifásica, com ênfase em *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e avaliação do potencial biotecnológico relacionado às atividades: antimicrobiana e antiviral.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e investigar a diversidade microbiana associada a macro-organismos marinhos.
- Aplicar a taxonomia polifásica, métodos moleculares e quimiotaxanômicos, para identificação de actinomicetos provenientes de ambiente marinho.
- Investigar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas de sedimento e macroorganismos marinhos quanto às atividades antimicrobiana e antiviral.

CAPÍTULO 1

Diversidade Microbiana associada a ambiente marinho.

Artigo: Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil

Cláudia B.A. Menezes, Rafaella C. Bonugli-Santos, Paula B. Miqueletto, Michel R.Z. Passarini, Carlos H. D. Silva, Mariana R. Justo, Rebeca R. Leal, Fabiana Fantinatti-Garboggini, Valéria M. Oliveira, Roberto G.S. Berlinck, Lara D. Sette.

Microbiological Research 165 (2010) 466 - 482.



Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil

Cláudia B.A. Menezes^a, Rafaella C. Bonugli-Santos^a, Paula B. Miqueletto^a, Michel R.Z. Passarini^a, Carlos H.D. Silva^a, Mariana R. Justo^a, Rebeca R. Leal^a, Fabiana Fantinatti-Garboggini^a, Valéria M. Oliveira^a, Roberto G.S. Berlinck^b, Lara D. Sette^{a,*}

^a*Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

^b*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil*

Received 17 August 2009; received in revised form 24 September 2009; accepted 27 September 2009

KEYWORDS

Marine invertebrates;
Microbial diversity;
Bacteria and fungi;
Ribosomal RNA;
ARDRA

Summary

Little is known about the microbial diversity associated with marine macroorganisms, despite the vital role microorganisms may play in marine ecosystems. The aim of the present study was to investigate the diversity of bacteria and fungi isolated from eight marine invertebrate and one algae samples. Data derived from ARDRA and sequencing analyses allowed the identification of marine-derived microorganisms isolated from those samples. Microbial strains identified up to the genus level revealed 144 distinct ribotypes out of 256 fungal strains and 158 distinct ribotypes out of 181 bacterial strains. Filamentous fungi were distributed among 24 different genera belonging to Ascomycota, Zygomycota and Basidiomycota, some of which had never been reported in the literature as marine invertebrate-inhabiting fungi (*Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Botryosphaeria* and *Cunninghamella*). Bacterial isolates were affiliated to 41 different genera, being *Bacillus*, *Ruegeria*, *Micrococcus*, *Pseudovibrio* and *Staphylococcus* the most abundant ones. Results revealed an unexpected high microbial diversity associated to the macroorganisms which have been collected and suggested the selection of certain microbial taxonomic groups according to the host. The combined data gathered from this investigation

*Corresponding author. Tel.: +55 19 21 39 2874; Tel.: +55 19 2139 2852.
E-mail address: lara@cpqba.unicamp.br (L.D. Sette).

contribute to broaden the knowledge of microbial diversity associated to marine macroorganisms, including as a promising source for the discovery of new natural products.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The ocean covers more than 70% of Earth's surface and is considered as a great reservoir of natural resources. However, the extent of marine biodiversity, especially of microorganisms, is barely known. It has been estimated that the biological diversity in marine ecosystems is higher than in tropical rain forests (Larsen et al. 2005). Marine microbial communities are composed of ubiquitous members that can be found not only in the surface waters of the sea, but also in the lower and abyssal depths from coastal to the offshore regions, and from the general oceanic to the specialized niches like blue waters of coral reefs to black smokers of hot thermal vents at the sea floor (Surajit et al. 2006; Schafer et al. 2001).

Marine invertebrates, especially sponges, represent an important source for potential active and biologically functional natural products (Osinga et al. 2001). Many of these compounds exhibit cytotoxic, antibacterial, antifungal, antiviral or anti-inflammatory activities (Blunt et al. 2008; Zhang et al. 2006; Schirmer et al. 2005). Several studies have reported the discovery of new bioactive compounds from marine organisms, focusing mainly on chemistry of secondary metabolites, which include now more than 15,000 structurally diverse bioactive compounds isolated during the last 30 years (Salomon et al. 2004). The secondary metabolism of marine-derived microorganisms started to be investigated much more recently. However, the ecological associations occurring between the microorganisms and the marine substrates have been greatly neglected (Kurtboke 2005).

In the terrestrial and marine environment, fungi are ecologically important intermediaries of energy that flows from detritus to higher trophic levels and play an important role in nutrient regeneration cycles as decomposers of dead and decaying organic matter (Bugni and Ireland 2004; Prasannarai and Sridhar 2001). On the other hand, marine bacteria serve as an important source of food for a variety of marine organisms and may also function as biological mediators through their involvement in the biogeochemical processes (Surajit et al. 2006).

The field of marine mycology has a relatively short history and has yielded so far the classification of two groups of marine fungi on the basis of their ability to grow and to reproduce in seawater

(Kohlmeyer and Kohlmeyer 1979). Obligate marine fungi are those that grow and sporulate exclusively in a marine or estuarine habitat, while facultative marine fungi are those from freshwater or terrestrial milieus that are able to grow (and possibly sporulate) in the marine environments. About 800 species of obligate marine fungi have been described, including representatives from the Basidiomycota, Ascomycota, mitosporic fungi and yeasts (Surajit et al. 2006).

Considering that conservation and the sustainable use of biological diversity requires a comprehensive knowledge about the species richness, abundance and distribution and that little is known about the phylogenetic and functional diversity of marine microbial communities, the aim of the present study was to investigate the diversity of filamentous fungi and bacteria from different samples of marine macroorganisms collected at the north coast of São Paulo State, Brazil.

Material and methods

Sampling of marine macroorganisms

Nine samples of marine macroorganisms, including the sponges *Amphimedon viridis* (AV); *Axinella corrugata* (AC); *Dragmacidon reticulata* (DR); *Geodia corticostylifera* (GC); *Mycale laxissima* (ML) and *Mycale angulosa* (MA); the ascidians *Didemnum ligulum* (DL) and *Didemnum* sp. (DSP), and the algae *Sargassum* sp. (AS), were collected in January 2007 in beach areas named Praia Guaecá (23°49S; 45°25W), Ilha Toque-Toque (23°51S; 45°31W) and Ilhota da Prainha (23°51S; 45°24W), in São Sebastião region, São Paulo State, Brazil, at depths between 5 and 10 m. The samples were placed in sterilized polyethylene bags containing seawater and immediately transported to the Center of Marine Biology of São Paulo University (CEBIMar).

Isolation and maintenance of microorganisms

In order to avoid external contamination during the microbial isolation procedure, algae, sponge and ascidian samples were firstly sterilized with 0.001 g l⁻¹ mercury chloride in 5% ethanol and then washed twice with sterilized seawater. Two

different methods were used to isolate filamentous fungi from *D. reticulata*, *M. laxissima*, *Didemnum* sp. and *A. viridis*, as follows: (1) Trituration: samples were triturated and serially diluted up to 100-fold with sterilized distilled water. Aliquots of 100 μ l were plated onto Petri dishes containing one of the following culture media described below, and; (2) direct plating: 1 cm³ pieces of each macroorganism sampled were placed over Petri dishes containing one of the culture media described below. Bacterial strains were isolated only from triturated samples. Aliquots of 100 μ l (10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6}) were inoculated onto Petri dishes containing one of the bacterial specific media described below. Agar plates were inoculated and incubated at 25 °C for 1-4 weeks. Isolation of colonies was conducted from the 2nd to the 30th day of plating. Pure cultures were obtained after serial transfers to the same culture medium used to plate the macroorganism samples. The maintenance of the isolates was performed by cryopreservation at -80 °C (10% glycerol) for both bacteria and fungi and by the Castellani method at 4 °C for filamentous fungi only.

Seven culture media supplemented with rifampicin (300 μ g ml⁻¹) were used for the isolation of filamentous fungi: glucose, peptone, yeast extract (GPY, glucose 1 g l⁻¹, peptone soymeal 0.5 g l⁻¹, yeast extract 0.1 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹, ASW 800 ml l⁻¹); tryptic soy agar (TSA, Oxoid); malt extract (MS, malt extract 30 g l⁻¹, peptone soymeal 3 g l⁻¹, agar 12 g l⁻¹, ASW 800 ml l⁻¹, pH 5.5); Tubakii media (TM, glucose 30 g l⁻¹, yeast extract 0.5 g l⁻¹, peptone 1 g l⁻¹, K₂HPO₄ 1 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g l⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.01 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹, ASW 800 ml l⁻¹); cellulose agar (CA, 10 g l⁻¹, yeast extract 1 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹, ASW 800 ml l⁻¹); oatmeal agar (OA, Oat 30 g l⁻¹, agar 20 g l⁻¹, ASW); potato carrot agar (PCA, Oxoid, pH 8.0) and corn meal media (CM, 42 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹, ASW 800 ml l⁻¹). Four culture media supplemented with cycloheximide (50 μ g ml⁻¹) were used for bacteria isolation: GPY, TSA, M1 (soluble starch 10 g l⁻¹, yeast extract 4 g l⁻¹, peptone 2 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹) and marine agar (Difco™, USA). All media were prepared with artificial seawater (ASW): KBr 0.1 g l⁻¹, NaCl 23.48 g l⁻¹, MgCl₂·6H₂O 10.61 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 1.47 g l⁻¹, KCl 0.66 g l⁻¹, SrCl₂·6H₂O 0.04 g l⁻¹, Na₂SO₄ 3.92 g l⁻¹, NaHCO₃ 0.19 g l⁻¹, H₃BO₃ 0.03 g l⁻¹.

Morphological characterization of filamentous fungi

Fungal morphology was characterized by colony observation with a stereoscope (Leica MZ6, Wet-

zlar, Germany) and by squash mounts stained with Lactophenol and Cotton Blue using a light microscope (Leica DM LS, Wetzlar, Germany). Fungi were identified based on these observations and by morphological criteria determined in the literature (Ellis 1971; Pitt 1979; Domsch et al. 1980).

Molecular characterization of microorganisms

Genomic DNA extraction and PCR amplification

Filamentous fungi and bacteria were cultured in the respective isolation media. Genomic DNA extraction was performed accordingly for filamentous fungi (Da Silva et al. 2008) and for bacteria (Pitcher et al. 1989). The 28S rRNA D1/D2 region of the filamentous fungi and 16S rRNA gene of the bacteria were amplified from genomic DNA by PCR using the following sets of primers, respectively: NL⁻¹m (5'GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG3') and NL-4m (5'GGT CCG TGT TTC AAG ACG3') (O'Donnell 1993) and 27f (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3') (Lane 1991) and 1401r (5'CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG3') (Heuer et al. 1997). PCR was performed in reaction mixtures containing 0.4 μ M each primer, 0.2 μ M dNTPs (GE Healthcare), 1.5 μ M MgCl₂ (Invitrogen), 2.0 U Taq polymerase (Invitrogen) and 1.0 \times reaction buffer (Invitrogen), in a final volume of 25 μ l for fungi (5-25 ng genomic DNA) and 50 μ l for bacteria (50-100 ng genomic DNA). The PCR amplifications were carried out using an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C for denaturation, 1 min at 55 °C for annealing, and 3 min at 72 °C for extension, with a final extension cycle of 3 min at 72 °C in an Eppendorf thermal cyclor.

ARDRA and sequencing analyses

PCR products were digested using the restriction enzymes *Hae*III, *Rsa*I and *Msp*I (GE Healthcare) for filamentous fungi and *Alu*I, *Hha*I (GE Healthcare) and *Dde*I (Invitrogen) for bacteria. Restriction reactions were carried out at 37 °C for 2 h and electrophoresis was run at 230 V for 2.5 h on 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 mg ml⁻¹). Band profile analyses were carried out using the GelCompar software version 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) and UPGMA-based dendrograms constructed from Dice's coefficient matrices (Dice 1945). One isolate representative of each distinct ribotype (cut off \geq 96% similarity) was sequenced for phylogenetic inference. Amplified products were purified using GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) for

subsequent sequencing using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for an automated MegaBace DNA Analysis System 1000 (GE Healthcare), in accordance to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed according to Da Silva et al. (2008) for filamentous fungi and Vasconcellos et al. (2009) for bacteria. Partial 28S rRNA and 16S rRNA sequences obtained from the isolates were assembled in a contig using the phred/Phrap/CONSED software. The identification was achieved by comparing the contiguous rRNA gene sequences obtained with rRNA sequence data from reference and type strains available in the public database GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLASTn routine. The sequences were aligned using CLUSTAL X program (Thompson et al. 1997) and analyzed with MEGA software Version 4.0 (Tamura et al. 2007). The evolutionary distances were derived from the sequence-pair dissimilarities, calculated as implemented in MEGA using the DNA substitution model reported by Kimura (1980). The phylogenetic reconstruction was done using the neighbour-joining (NJ) algorithm (Saitou and Nei 1987), with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs, using the routines included in MEGA software.

Statistical analyses based on ARDRA data

Randomization analyses based on ARDRA data were performed using the independent sampling algorithm, implemented in the EcoSim software (Gotelli and Entsminger 2003). This module of EcoSim provides a computer-sampling algorithm, in which a specified number of individuals (i.e., sub-samples of the original one) are randomly drawn, without replacement, from the total community sample, creating pseudo-communities. Various sub-sample sizes were specified and for each sub-sample size, 1000 pseudo-communities were drawn from the original one. Data from these were used to calculate richness and Shannon-Wiener (diversity) and Dominance indices. The resultant values were used to calculate the mean and the 95% confidence intervals for each index at each sub-sample size specified.

Results

Isolation and diversity of marine-derived filamentous fungi

A total of 256 filamentous fungal strains were obtained from the Brazilian invertebrate samples (*A. viridis*, *Didemnum* sp., *D. reticulata* and *M. laxissima*), mainly by using the direct plating

method (75%). MS medium was the most appropriate for fungi isolation, resulting in 37% of the isolated strains, followed by media TM (15%), PCA (12%), AC and GPY (10%), OA (9%) and CM (5%). The number of marine-derived fungal strains obtained was quite similar among the marine invertebrates sampled, being 67 from *D. reticulata*, 65 from *A. viridis*, 63 from *Didemnum* sp. and 61 from *M. laxissima*.

ARDRA analyses and sequencing of representative ribotypes revealed the presence of 144 distinct ribotypes distributed among 24 different genera of filamentous fungi (Figure 1), which were affiliated to the phyla Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota. The majority of the fungi (230 isolates, 134 distinct ribotypes) belonged to Ascomycota and was distributed among seven different orders and 18 genera (Figure 2): Botryosphaerales (*Botryosphaeria*); Capnodiales (*Cladosporium*); Eurotiales (*Aspergillus* and *Penicillium*); Hypocreales (*Acremonium*, *Bionectria*, *Fusarium* and *Trichoderma*), Phyllachorales (*Colletotrichum* and *Glomerella*); Pleosporales (*Alternaria* and *Cochliobolus*) and Xylariales (*Eutypella*, *Pestalotiopsis* and *Xylaria*). Additionally, representatives of the genera *Apiospora* and *Arthrinium* (family Apiosporaceae) and *Phoma* (mitosporic Ascomycota) were found. The genus *Trichoderma*, with 91 representatives and 32 distinct ribotypes, was the most frequent one. However, a great diversity was also observed for the genera *Penicillium* (17 isolates and 14 distinct ribotypes), *Aspergillus* (18 isolates and 16 distinct ribotypes) and *Fusarium* (33 isolates and 17 distinct ribotypes) (Figure 1). The phylum Zygomycota was represented by 13 isolates (7 distinct ribotypes) affiliated to the order Mucorales (genera *Cunninghamella*, *Mucor* and *Rhizopus*), whereas the phylum Basidiomycota was represented by four isolates (3 distinct ribotypes) affiliated to the orders Agaricales, Atheliales and Polyporales and closely related to the genera *Marasmiellus*, *Amphinema* and *Trametes/Perniporia*, respectively (Figure 2).

Representatives of the orders Hypocreales, Eurotiales, Pleosporales and Xylariales (phylum Ascomycota) were found in all samples of marine invertebrates used for fungi isolation. However, the genera *Acremonium*, *Arthrinium* and *Botryosphaeria* were only found associated with the sponge *D. reticulata* and the genera *Alternaria*, *Pestalotiopsis* and *Cunninghamella* were observed only associated with the ascidian *Didemnum* sp. (Figure 1). In addition, the phylum Basidiomycota was only detected in sponges *A. viridis* and *D. reticulata* (Figure 1).

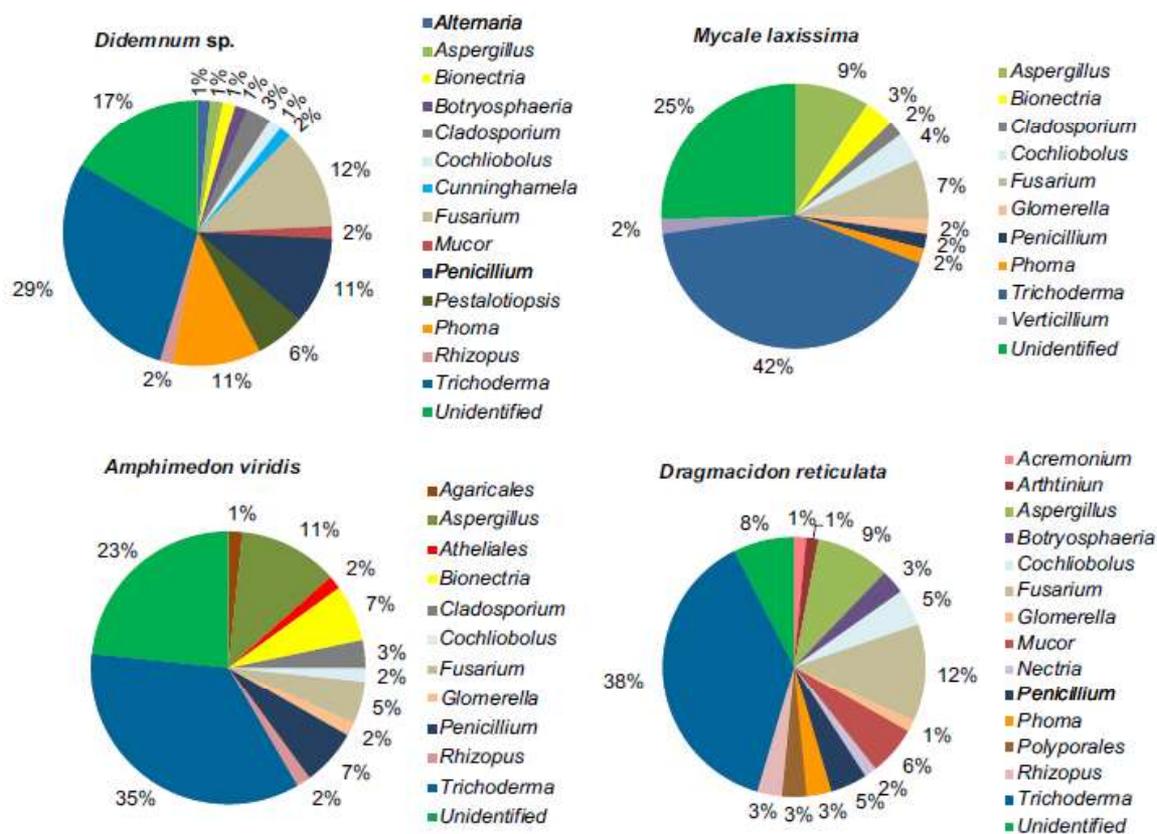


Figure 1. Occurrence of filamentous fungi in marine macroorganism samples: ascidian *Didemnum* sp. (66 isolates, 47 ribotypes); sponge *Mycale laxissima* (55 isolates, 35 ribotypes); sponge *Amphimedon viridis* (60 isolates, 43 ribotypes) and sponge *Dragmacidon reticulata* (66 isolates, 43 ribotypes).

About 19% (27 ribotypes) of the total number of distinct ribotypes (144) obtained in this study were unidentified fungi. Among them, 18 ribotypes could not be identified due to their low quality sequences. The remaining 9 ribotypes showed high sequence similarity with fungi which have not been identified yet (isolates F169 and F186) or presented low sequence similarity with fungal sequences available at the database, forming a separate cluster in the phylogenetic tree [isolates F176(=F215), F197 and F229 (=F226, F184)] (Figure 2).

Isolation and diversity of marine-derived bacteria

A total of 181 bacteria were isolated from algae, sponges and ascidians in the present investigation. M1 medium was the most appropriate for bacteria isolation, allowing the recovery of 45% of the

bacterial strains, followed by the media TSA (27%), GPY (14%) and MA (14%).

ARDRA analysis yielded 158 distinct bacterial ribotypes, revealing a high bacterial diversity. The largest diversity was recovered from the ascidian *D. ligulum*, with 32 isolates and 29 distinct ribotypes, followed by algae *Sargassum* (26 isolates and 24 distinct ribotypes), sponges *M. angulosa* (21 isolates and 18 distinct ribotypes), *M. laxissima* (19 isolates and 18 distinct ribotypes) and *A. viridis* (19 isolates and 17 distinct ribotypes), ascidian *Didemnum* sp. (18 isolates and 17 distinct ribotypes), and sponges *G. corticostylifera* (17 isolates and 17 distinct ribotypes), *D. reticulata* (15 isolates and 11 distinct ribotypes) and *A. corrugata* (14 isolates and 14 distinct ribotypes) (Figure 3).

16S rRNA gene sequencing-based analysis showed that marine-derived bacteria were related to 41 genera distributed among the phyla Proteobacteria (35.4%), Actinobacteria (30.4%), Firmicutes (28.7%) and Bacteroidetes (1.1%). Eight isolates (4.4%) were classified as unidentified bacteria, since the

first 100 hits in Blastn analyses were uncultured bacteria. The phylum Proteobacteria included representatives of Classes Alphaproteobacteria (54 isolates), represented by the genera *Aurantimonas*, *Brevundimonas*, *Pseudovibrio*, *Stappia*, *Ruegeria* and *Nautella*, and Gammaproteobacteria (10 isolates),

represented by *Acinetobacter*, *Endozoicomonas*, *Microbulbifer*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Vibrio* and *Stenotrophomonas* (Figure 4). The Firmicutes were represented by 9 genera, including *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Paucisalibacillus*, *Planomicrobium*, *Staphylococcus* and *Terribacillus* (Figure 4). The phylum Actinobacteria encompassed seventeen genera of cultivable actinobacteria, namely *Agrococcus*, *Artrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curto-bacterium*, *Gordonia*, *Janibacter*, *Kineococcus*, *Knoellia*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardioidea*, *Sacharopolyspora* and *Williamsia* (Figure 5). Finally, the phylum Bacteroidetes was represented by only 2 isolates, related to the genera *Aquimarina* and *Dokdonia*.

Bacillus was the most abundant genus recovered, with 33 isolates, followed by *Ruegeria* with 31 isolates and *Micrococcus* with 23 isolates. All of them revealed broad distribution among the marine macroorganisms sampled (Figure 3). On the other hand, several genera were isolated uniquely from one host. This was the case of *Dokdonia* and *Knoellia*, recovered only from algae *Sargassum*; *Acinetobacter*, *Paucisalibacillus*, *Paenibacillus* and *Exigobacterium*, isolated only from the ascidian *D. ligulum*; *Aquimarina*, *Kineococcus*, *Photobacterium*, *Lysinibacillus* and *Terribacillus*, isolated only from the sponge *M. laxissima*; *Marmoricola*, *Pantoea* and *Planomicrobium*, recovered only from the sponge *G. corticostylifera*; *Saccharopolyspora* and *Agrococcus*, isolated only from the sponge *A. viridis*; *Stenotrophomonas* and *Janibacter*, isolated only from the sponge *A. corrugata* and the genera *Halobacillus* and *Gordonia*, found only in sponge *M. angulosa* and ascidian *Didemnum* sp., respectively (Figure 3).

The highest bacterial richness was obtained from the ascidian *D. ligulum*, which harbored 14 bacterial genera, followed by the sponge *G. corticostylifera* and the algae *Sargassum*, with 12 and 11 bacterial genera, respectively (Figure 3).

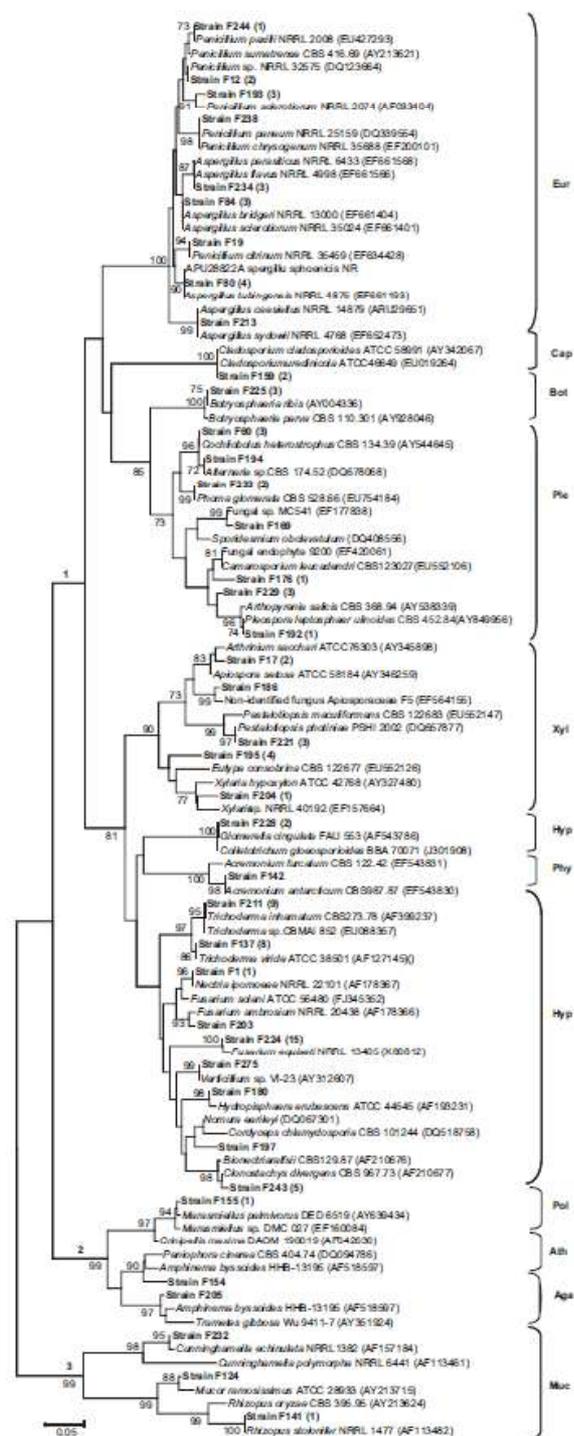


Figure 2. Phylogenetic analysis of partial 28S rDNA gene (D1/D2 region) sequences of fungal isolates and related microorganisms belonging to the phylum: (1) Ascomycota, (2) Basidiomycota and (3) Zygomycota. Evolutionary distances were based on Kimura 2p model and tree reconstruction on the neighbour joining method. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) > 70% are listed. *Mucor ramosissimus* ATCC 28933 was used as outgroup. Order: Eur (Eurotiales), Cap (Capnodiales), Bot (Botryosphaeriales), Pl (Pleosporales), Xyl (Xylariales), Hyp (Hypocreales), Phy (Phyllachorales), Pol (Polyporales), Ath (Atheliales), Aga (Agaricales) and Muc (Mucorales).

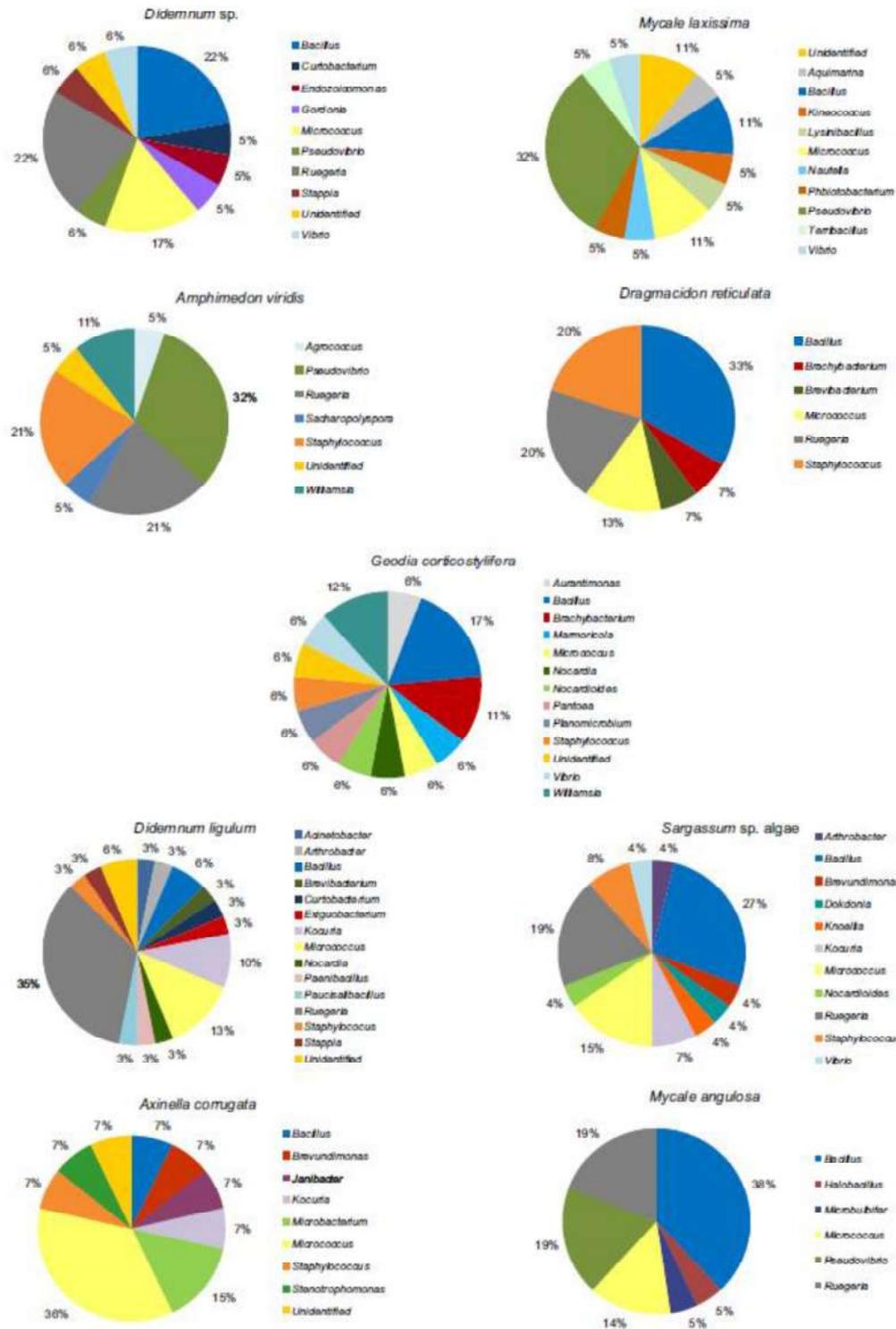


Figure 3. Occurrence of bacterial genera in marine macroorganism samples: ascidian *Didemnum* sp. (18 isolates, 17 ribotypes); sponge *Mycale laxissima* (19 isolates, 18 ribotypes); sponge *Amphimedon viridis* (19 isolates, 17 ribotypes); sponge *Dragnacidon reticulata* (15 isolates, 11 ribotypes); sponge *Geodia corticostylifera* (17 isolates, 17 ribotypes); ascidian *D. ligulum* (32 isolates, 29 ribotypes); algae *Sargassum* sp. (26 isolates, 24 ribotypes); sponge *Axinella corrugata* (14 isolates, 14 ribotypes) and sponge *Mycale angulosa* (21 isolates, 18 ribotypes).

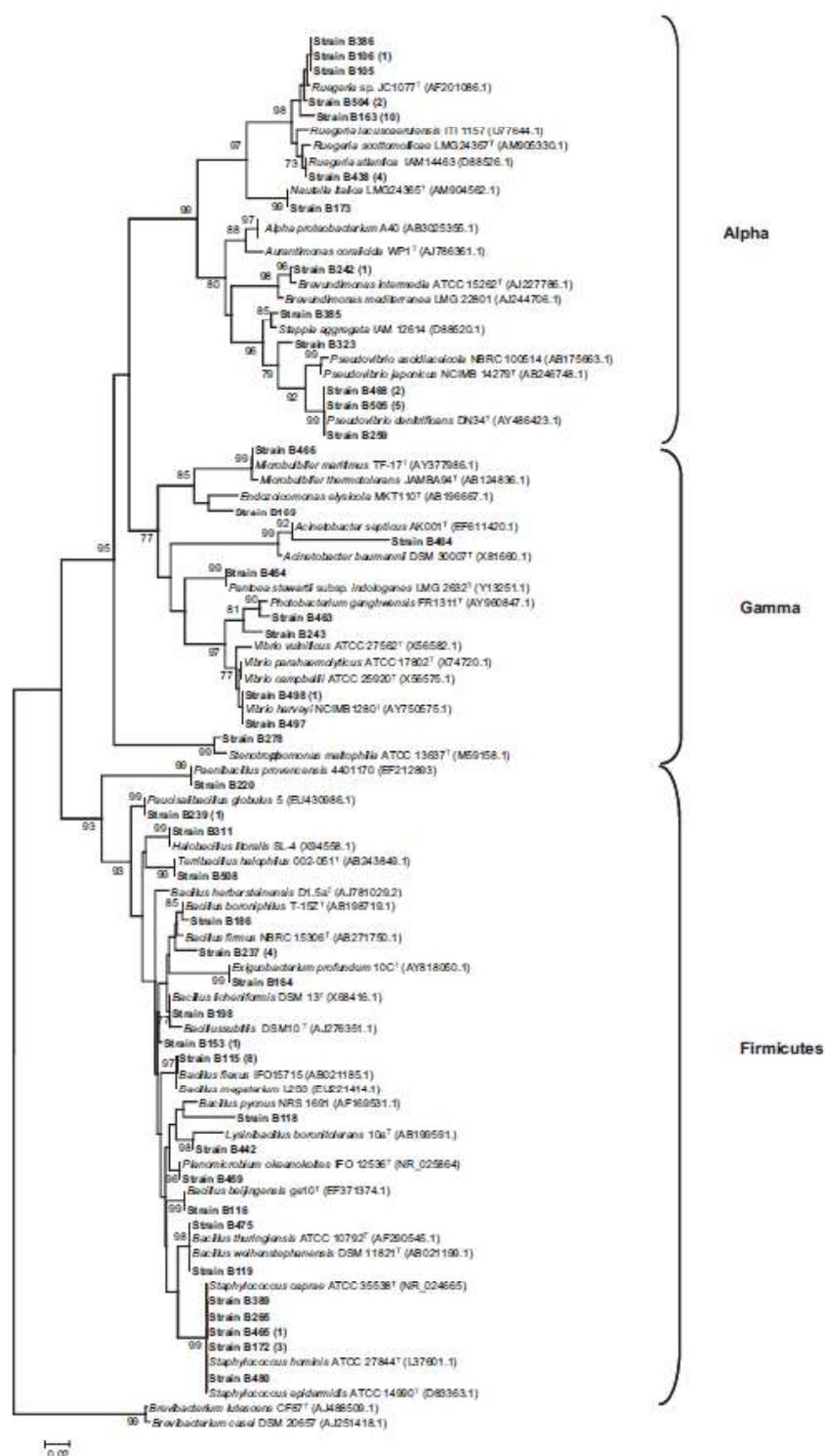


Figure 4. Phylogenetic analysis of partial 16S rRNA gene sequences of bacterial isolates and related microorganisms belonging to the phyla Proteobacteria and Firmicutes. Evolutionary distances were based on Kimura 2p model and tree reconstruction on the neighbour joining method. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) > 70% are listed. *Brevibacterium lutescens* CF87^T and *B. casei* DSM 20657^T were used as outgroup. Alpha=Alphaproteobacteria Class; Gamma=Gammaproteobacteria Class.

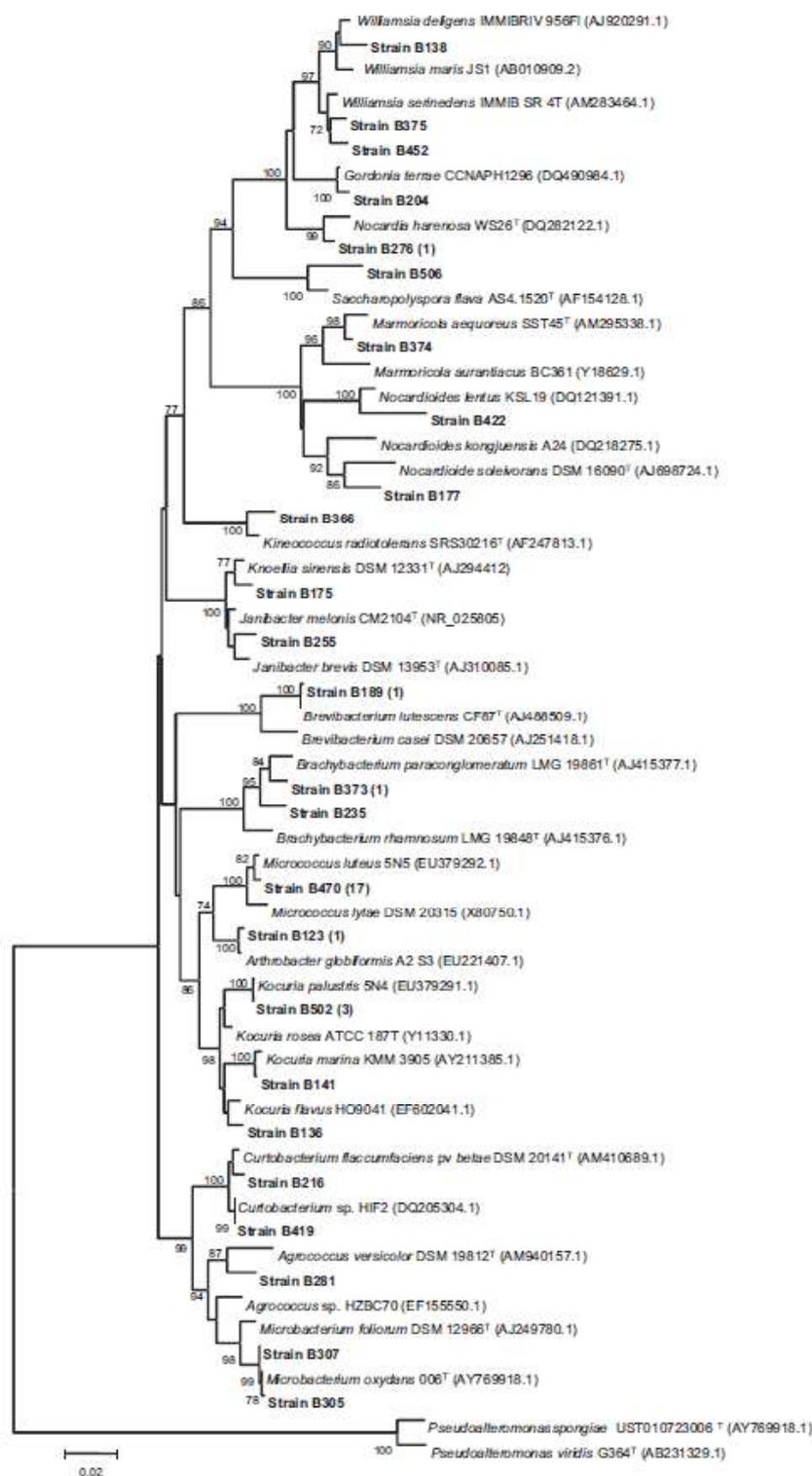


Figure 5. Phylogenetic analysis of partial 16S rRNA gene sequences of bacterial isolates and related microorganisms belonging to the phylum Actinobacteria. Evolutionary distances were based on Kimura 2p model and tree reconstruction on the neighbour joining method. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) >70% are listed. *Pseudoalteromonas spongiae* UST010723-006^T and *P. viridis* G-364^T were used as outgroups.

Statistical comparisons of microbial diversity among marine invertebrates based on ARDRA data

In order to investigate the microbial diversity derived from marine macroorganisms, diversity indices were used to calculate the microbial richness, diversity and dominance from the ARDRA data. Since these indices are dependent on the total number of ribotypes analyzed and the microorganisms (filamentous fungi and bacteria) were unequally sampled, randomization analyses were used to create pseudo-communities at specified subsample sizes and thus allow the comparison among the marine macroorganisms. Relatively high ribotype richness and diversity index (Shannon-Wiener) values were observed for cultivable microbial communities recovered from marine macroorganisms (data not shown).

In general, the cultivable fungal and bacterial communities recovered did not present statistically different richness and diversity indices based upon ARDRA data at all the sub-sample sizes analyzed. One exception was the bacterial community of the sponge *D. reticulata* (DR), which showed a tendency for lower values of richness and diversity indices (data not shown). However, the sample size of *D. reticulata* (DR) was substantially smaller than the samples recovered from the other macroorganisms. Therefore, further sampling would be necessary to allow conclusive comparisons. The steep shape of the richness curves for both bacteria and fungi, strongly indicates that much more diversity may be encountered if larger sample efforts are made (data not shown). The dominance index, the fraction of the community that is represented by the most common ribotype, rapidly reached relatively low values for all cultivable microbial communities derived from marine macroorganisms (data not shown), thus revealing that these did not present significant dominance of any particular ribotype.

Discussion

The nature and diversity of filamentous fungi and bacteria associated with marine macroorganisms is still poorly understood. Research reports on marine-derived fungi and bacteria have typically concentrated on natural product chemistry, since these microorganisms have been shown to produce novel bioactive natural compounds that are not found in terrestrial strains (Blunt et al. 2008, König et al. 2006, Jensen and Fenical 2002). In order to

achieve a broader characterization of microbial assemblages in a marine environment, a culture-dependent approach was successfully applied in the present investigation, resulting in the recovery of 256 filamentous fungi and 181 bacteria from invertebrate and algae samples.

Marine fungi have long been known to exist in the marine environment. Ecologically, they are important intermediaries of energy flow and play an important role in nutrient regeneration cycles. Moreover, some marine fungi also cause diseases of marine animals and plants while others form mutualistic symbiotic relationships with other organisms (Wang et al. 2006). Investigations of the distribution of marine-derived fungi based on chemical assays revealed that sponges have commonly yielded the greatest taxonomic diversity (Bugni and Ireland 2004). However, in the present study the ascidian *Didemnum* sp. presented the highest diversity of filamentous fungi. These results could be explained by the fact that fungi classified as 'sponge-generalists' have shown to produce novel bioactive compounds (Bugni and Ireland 2004; Wang et al. 2006; Baker et al. 2008) and, for that reason, there is a large number of investigations being conducted on sponge-derived fungi.

Marine-invertebrate-inhabiting fungi isolated in the present work have been commonly found in both terrestrial and marine habitats. Data derived from taxonomic characterization allowed the identification of 24 distinct taxa belonging to the Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota and mitosporic fungi. It is worth to mention that 6% (9 ribotypes) of the total number of distinct fungi ribotypes may possibly represent new species of filamentous fungi, considering the high sequence similarity with fungi that are yet unidentified or the low sequence similarity with known fungi from the databases. However, additional taxonomical analyses based on a polyphasic approach should be conducted in order to confirm the new species hypothesis.

The majority of the fungal isolates derived from the marine invertebrates sampled in the present work were shown to be related to Ascomycota. Representatives of these fungi have been isolated from marine algae, cnidarians, seagrasses, sponges and tunicates in different parts of the world (Li and Wang 2007; Da Silva et al. 2008). The predominance of ascomycetes in aquatic habitats has been discussed in the literature. This group represents fungi that are readily cultivable (Baker et al. 2008) and could be easily recovered when culture-dependent techniques are applied. The major hypothesis to explain this predominance is the

presence of spores with adaptation (appendages) to the aquatic ecosystem, which facilitates buoyancy in water and substrate adherence (Prasannarai and Sridhar 2001). According to Vijaykrishna et al. (2006), species of freshwater ascomycetes share a massive apical ring, which possibly facilitates the spores dispersion, explaining why certain ascomycetes are better adapted to aquatic habitats than other fungal groups including the basidiomycetes.

All marine invertebrates studied in this work yielded a great number of Ascomycota fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusarium*, which have already been reported in the literature as invertebrate-inhabiting fungi (Baker et al. 2008; Da Silva et al. 2008; Holler et al. 2000) and as a prolific source of biologically active secondary metabolites, such as polyketides with antitumoral and/or antimicrobial activities (Bugni and Ireland 2004). In addition, species from the genus *Trichoderma* are well known by their capacity to produce cellulolytic enzymes. *Trichoderma reesei* is the main industrial source of cellulases and hemicellulases harnessed for the hydrolysis of biomass to simple sugars, which can then be converted to biofuels such as ethanol and other chemicals (Le Crom et al. 2009). One explanation for the high number of bioactive compounds reported from marine-derived *Aspergillus* and *Penicillium* spp. is that representative of these genera are salt tolerant, fast growing and easily obtained from many substrates. On the other hand, *Aspergillus sydowii* is considered the causative agent of an epizootic disease affecting sea fan corals (Lewbart 2006) and *Fusarium solani* is known for its ability to infect various marine crustaceans (Bugni and Ireland 2004).

Some Ascomycota recovered in the present work are not common in marine sponges and ascidians, such as *Pestalotiopsis* spp., which have been isolated from Micronesia seawood (Masuma et al. 2001); *Eutypella* spp., already isolated from a Brazilian marine zoanthid (da Silva 2008 and from a Chinese mollusk (Ciavatta et al. 2008), and *Xylaria* spp., already isolated from a south China sea coast (Lin et al. 2001) and from coral reefs in Puerto Rico (Toledo-Hernández et al. 2008). It is worth to note that these three fungal genera belong to Xylariales order, which have been proven to be prolific sources of novel bioactive compounds (Ciavatta et al. 2008; Lin et al. 2001). Additionally, four Dematiaceous fungi isolated from the sponge *D. reticulata* (3) and from the ascidian *Didemnum* sp. (1) identified as *Botrysphaeria* sp. (Ascomycota) have only been reported as coral-derived fungi in Papua New Guinea (Alves et al. 2007).

Representatives of Zygomycota, *Mucor* and *Rhizomucor*, have been broadly isolated from marine samples, including algae, cnidarians and sponges (Da Silva et al. 2008; Holler et al. 2000). However, the genus *Cunninghamella* was only reported in marine water (Gomes et al. 2008). Fungi from the genus *Mucor*, *Rhizomucor* and *Cunninghamella* have representatives with high biotechnological potential for producing bioactive compounds, such as lactic acid, lipases, proteases, α -amylases and β -glucanases (Celestino et al. 2006; Millati et al. 2005).

Basidiomycota fungi are rarely isolated from marine samples, however, in the present work, two representatives of Agaricales (with the same ribotype and from different hosts), one representative of Polyporales and one representative of the Atheliales were recovered from the marine sponges *D. reticulata* and *A. viridis*. Gao et al. (2008) first reported the presence of fungi belonging to Agaricales and Polyporales orders in the sponge *Suberites zeteki*. However, it is important to highlight that this is the first report on the isolation of basidiomycete from Atheliales associated with marine sponges. As filter feeders, sponges are exposed to pollutants present in waters, and accumulated impurities from phytoplankton, or other suspended matters. Hence, it is reasonable to believe that some microbes in sponges produce hydrolytic enzymes to convert these organic matters into nutrients (Wang et al. 2006). Basidiomycete fungi are considered as the most efficient microorganisms to produce enzymes responsible for the breaking down of lignocellulosic material and colored pollutants. The production of these enzymes by marine-derived fungi from ascomycota, zygomycota and basidiomycota has been reported in the literature (Bonugli-Santos et al. 2009, Raghukumar 2008). These studies have been focused mainly on lignocellulose-degrading enzymes production for black liquor, molasses, synthetic dyes and textile effluents decolorization and for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. Taking into account that in these processes the salinity and pH are the main factors that can influence the enzyme production, marine-derived fungi are expected to present a natural advantage (in comparison to their terrestrial counterparts) to be used in high salt concentration processes or habitats.

The relationship between terrestrial and aquatic fungi was reported by Vijaykrishna et al. (2006) and revealed that, although freshwater taxa (including marine fungi) have evolved directly from terrestrial species, this evolution has been independent for several lineages. Opposite findings were reported

by Hibbet et al. 2001, who studied the relationship between terrestrial and aquatic basidiomycetes and demonstrated that the latter was closely related to the terrestrial fungi, since a specific aquatic clade was not found. The same results were shown in the present work, once the marine-derived isolates recovered were only related to terrestrial counterparts in the phylogenetic tree (Figure 2).

In recent years, the marine environment has also shown a surprisingly diverse abundance of bacteria, including new species of Alphaproteobacteria (Muramatsu et al. 2007), Gammaproteobacteria (Brettar et al. 2002), Epsilonproteobacteria (Campbell et al. 2001), as well as actinomycetes (Maldonado et al. 2005). These microorganisms have been isolated from marine sediments, seawater and marine invertebrates. The culture-dependent approach used in this study resulted in the isolation of 181 bacteria distributed in 41 genera affiliated to the phyla Proteobacteria (Alpha- and Gammaproteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes, corroborating previous literature data.

Alphaproteobacteria have shown to be numerically dominant in the water column using culture-independent molecular techniques (Venter et al. 2004). Additionally, some marine invertebrates can harbor or be dominated by members of this taxon (Sfanos et al. 2005; Webster and Hill 2001).

In this work, Alphaproteobacteria accounted for 30% of total bacterial isolates, encompassing mainly isolates belonging to genera *Pseudovibrio* and *Ruegeria*. The latter was one of the most abundant genera found and widely distributed among the hosts investigated. Bacteria related to genus *Ruegeria* require NaCl or sea salts for growth and have been isolated from marine environment and sponges (Lee et al. 2007). The prevalence of genus *Ruegeria* associated to marine organisms could be related with quorum sensing systems commonly found in Proteobacteria, which allows cell-to-cell communication and may be involved in the symbiotic interactions between bacteria and their hosts (Mohamed et al. 2008). The genus *Pseudovibrio* has only three reported species, named *Pseudovibrio denitrificans*, *P. ascidiaceicola* and *P. japonicus*, all isolated from marine environments (Hosoya and Yokota 2007, Fukunaga et al. 2006, Shieh et al. 2004). *Ruegeria* spp. and *Pseudovibrio* spp. are widely reported as presenting potential to produce bioactive compounds, which are quite advantageous from an ecological point of view (Sertan-de Guzman et al. 2007; Mitova et al. 2004; Hentschel et al. 2001).

Gammaproteobacteria found in this study were diverse but not numerically abundant. This class

included *Vibrio* spp., which were isolated from sponges, ascidians and *Sargassum* algae. These bacteria are consistently found in marine invertebrates, mainly in oysters (Gamier et al. 2007, Comeau et al. 2005), corals (Brück et al. 2007) and sponges (Mohamed et al. 2008). *Vibrio* spp. are typically much more abundant in sediments, plankton, shellfish, oysters and corals than in the water column (Comeau et al. 2005) and this abundance may be related to their pathogenicity, resulting in increased oysters mortality in summer (Garnier et al. 2007) and in coral bleaching disease (Rosenberg et al. 2007).

The class Gammaproteobacteria also included one representative of the genus *Endozoicomonas*, recovered from the marine invertebrate *Didemnum* sp. This recently described genus has only one species, *E. elysicola*. The type strain was isolated from the sea slug *Elysia ornate* (Kurahashi and Yokota 2007). Additionally, one isolate of the genus *Microbulbifer* was recovered from the marine invertebrate *M. angulosa*. Bacteria in the genus *Microbulbifer* tend to be moderately halophilic and are often isolated from marine samples, occasionally marine invertebrates. These bacteria are able to hydrolyze complex polysaccharides and some members are cellulolytic, what could explain their abundance in marine macroorganisms such as ascidians, which are encased in a tunic comprised of cellulose (Riesenfeld et al. 2008).

Representatives of phylum Firmicutes, *Bacillus* spp., together with *Ruegeria* spp., were the most abundant bacteria isolated in this work, and showed wide distribution among the macroorganisms sampled. Although the majority of the Bacilli identified in this study are usually terrestrial bacteria, studies focusing on the phylogeny and biodiversity of marine Bacilli have shown that *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* are common inhabitants of marine environments (Gontang et al. 2007). One representative of *B. firmus* was recovered from the ascidian *Didemnum* sp. This bacterial species belongs to halotolerant groups without being obligate marine bacteria, and seems to be involved in biogeochemical cycles and diverse degradation processes (Etoumi et al. 2009). Many Gram-positive bacteria are known to generate spores under adverse conditions, such as those encountered in marine ecosystems, and this is thought to ensure their survival within the marine invertebrates (Etoumi et al. 2009). Diverse antibiotics including cyclic peptides, cyclic lipopeptides and novel thiopeptides have been reported from marine *Bacillus* sp. (Anand et al. 2006). Other representatives from Firmicutes recovered in this

study, such as *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Planomicrobium* and *Exiguobacterium*, have been previously found in marine samples as well (Shnit-Orland and Kushmaro 2009; Gontang et al. 2007; Vishnivetskaya et al. 2006; Fiedler et al. 2005).

Actinobacteria found in the present investigation have been already isolated from marine environments, including *Knoellia*, *Nocardia* (Bredholdt et al. 2007; Zhang et al. 2006; Maldonado et al. 2005), *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Gordonia* and *Williamsia* (Fiedler et al. 2005), *Arthrobacter* (Farris and Olson 2007), *Micrococcus* (Cabaj and Kosakowska 2007), *Janibacter* (Kageyama et al. 2007), *Kineococcus* (Lee 2006), *Nocardioidea* (Dastager et al. 2009, Kim et al. 2009), *Brevibacterium* (De et al. 2008; Lee 2008a), *Agrococcus* (Lee 2008b), *Saccharopolyspora* (Pimentel-Elardo et al. 2008) and *Brachybacterium* (Chelossi et al. 2006; Montalvo et al. 2005). The genus *Curtobacterium* has been previously reported in marine samples only by culture-independent methods (Gontang et al. 2007).

Surprisingly, the genus *Streptomyces*, reported as the most abundant culturable actinobacteria group found in marine samples (Zhang et al. 2008), was not recovered from the marine invertebrates and algae analyzed in this work. It should be noted that cultivation-based approaches are limited since the high selectivity of isolation media and culturing conditions usually allow only a small fraction of the bacteria present within a marine sample to be isolated (Webster and Hill 2001) and further efforts are needed to improve selective procedures for the isolation of representative marine actinobacteria.

Actually, little is known about the diversity of actinobacteria in marine habitats compared to the diverse range isolated from terrestrial environments, even though these organisms have been studied in more detail than members of other groups of prokaryotes due to their biotechnological importance. Members of the Actinobacteria class have considerable value as prolific producers of biologically active secondary metabolites, such as antibiotics and other therapeutic compounds, in addition to vitamins and enzymes (Mincer et al. 2005; Jensen et al. 2007). Like their terrestrial relatives, marine actinobacteria may play an important role in the breakdown of recalcitrant organic matter and therefore in the ocean biogeochemical cycles (Surajit et al. 2006). Additionally, even as spores, marine Gram-positive bacteria have the capacity to impact their surrounding chemical environment, as evidenced by their capacity to oxidize metals (Gontang et al. 2007). Undoubtedly, knowledge of actinobacteria diversity and distribu-

tion in marine systems will contribute to the understanding of their ecology and aid to improve bioprospecting strategies (Zhang et al. 2006).

Data derived from ARDRA and sequencing analyses enabled us to identify marine-derived microorganisms and revealed a high microbial diversity associated to the macroorganisms obtained. Representatives of filamentous fungi and bacteria isolated from Brazilian marine algae, ascidians and sponges samples belonged to 65 (24 fungal; 41 bacterial) different genera known to be associated with terrestrial and marine environments, including 5 groups (4 fungal; 1 bacterial) that have never been reported in the literature as marine invertebrate-derived microorganisms. The results suggested the selection of certain microbial taxonomic groups according to the host. These data may contribute to unravel specific ecological interactions known to occur between microorganisms and marine macroorganisms. Specific invertebrate-microbial associations are suspected to play a major role in maintaining coral health by protecting the host from invasion of potentially pathogenic microbes (Klaus et al. 2007; Salyers and Whitt 1994). It has been suggested that the resident microbial populations compete with invading microbes for nutrients and ecological niches within the mucus and tissue of the corals (Klaus et al. 2007). In addition, a recent study has showed that the microbiota associated with the cnidarian *Hydra* was conserved between samples maintained in the laboratory for 30 years and fresh samples taken from the marine environment (Fraune and Bosch 2007).

Marine microorganisms are considered a promising source of novel drugs due to their biodiversity and consequent chemodiversity, which, to date, are largely unexplored. Under varying ecological and physicochemical conditions in the oceans, microorganisms are able to mutate, evolve and adapt in a particular environment more readily than higher life forms. Adaptation may include the production of specific secondary metabolites that are important in their survival either as free-living organisms in the water or sediment, or in association with other marine organisms (Jensen and Fenical 1996). The microbiological richness of the macroorganism environment indicates that cultivation studies are highly relevant and are likely to result in the discovery of new microbes and novel metabolic pathways.

In conclusion, this investigation represents an emerging view of the filamentous fungi and bacterial diversity from Brazilian marine macroorganisms, since, to our knowledge, there were no previous reports on fungi and/or bacteria

associated with sponges *A. viridis*; *A. corrugata*; *D. reticulata*; *G. corticostylifera*; *M. laxissima*; *M. angulosa*; the ascidians *D. ligulum* and *Didemnum* sp., and the algae *Sargassum* sp. anywhere else in the world. Additionally, marine-derived filamentous fungi and bacteria recovered in the present work may represent a promising source of microbial genetic resources to be biotechnologically explored. The marine-derived isolates are part of the research collection associated to the Brazilian Collection of Microorganisms from Environment and Industry (CBMAI) and are currently being investigated in the search for bioactive compounds, such as antitumoral, antimicrobial and enzymes (lipases, cellulases and ligninases). Special attention will be given to the isolates representing putative new species, since they might show ability to produce yet undescribed bioactive compounds.

Acknowledgements

The authors thank to Professor Marcio dos Reis Custódio (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo) for the assistance in the collection and identification marine macroorganisms, as well as to Dr. Alvaro Esteves Migotto and the technical staff of the Centro de Biologia Marinha (Universidade de São Paulo) for logistical support. Financial support and scholarships provided by FAPESP (05/60175-2) and CNPq and also gratefully acknowledged.

References

- Alves A, Phillips AJL, Henriques I, Correia A. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Res Microbiol* 2007;158:112-21.
- Anand TP, Bhat AW, Shouche YS, Roy U, Siddharth J, Sarma SP. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol Res* 2006;161(3):252-62.
- Baker PW, Kennedy J, Dobson ADW, Marchesi JR. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haloclona simulans* isolated from Irish coastal waters. *Mar Biotechnol*, 2008;10.1007/s10126-008-9169-7.
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2008;25:35-94.
- Bonugli-Santos RC, Durrant LR, da Silva M, Sette LR. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbiol Technol*, 2009;10.1016/j.enzmictec.2009.07.014.
- Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova LP, Zotchev SB. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* 2007;9(11):2756-64.
- Brettar I, Christen R, Hofle MG. *Rheinheimera baltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1851-7.
- Brück TB, Brück WM, Santiago-Vázquez LZ, McCarthy PJ, Kerr RG. Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. *Mar Biotechnol* 2007;9:561-76.
- Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* 2004;21:143-63.
- Cabaj A, Kosakowska A. Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. *Microbiol Res* 2007;10.1016/j.micres.2007.07.001.
- Campbell BJ, Christian J, Kostka JE, Luther GW, Cary SC. Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the Epsilon subdivision of the Proteobacteria enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4566-72.
- Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochem* 2006;7:23.
- Chelossi E, Mancini I, Sepčić K, Turk T, Faimali M. Comparative antibacterial activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* and their synthetic analogues. *Biomol Eng* 2006;23(6):317-23.
- Ciavatta ML, Lopez-Gresa MP, Gavagnin M, Nicoletti R, Manzo E, Mollo E, et al. Cytosporin-related compounds from the marine-derived fungus *Eutypella scoparia*. *Tetrahedron* 2008;64:5365-9.
- Comeau AM, Buenaventura E, Suttle CAA. Persistent, productive, and seasonally dynamic vibriophage population within Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Environ Microbiol* 2005;71(9):5324-31.
- Da Silva M, Passarini MRZ, Bonugli RC, Sette LD. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterization and RBBR decolorization screening. *Environ Technol* 2008;29(12):1331-9.
- Dastager SG, Lee J, Ju Y, Park D, Kim C. *Nocardioides sediminis* sp. nov., isolated from a sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59(2):280-4.
- De J, Ramaiah N, Vardanyan L. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar Biotechnol* 2008;10(4):471-7.
- Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 1945;26:297-302.
- Domsch KK, Gams W, Anderson TH. In: *Compendium of soil fungi*. New York: Academic Press; 1980.
- Ellis MB. *Dematiaceae Hyphomycetes*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute; 1971.

- Ettoumi B, Raddadi N, Borin S, Daffonchio D, Boudabous A, Cherif A (2009) Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *J Basic Microbiol* 10.1002/jobm.200800306.
- Farris MH, Olson JB. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol* 2007;45:376-81.
- Fiedler H, Bruntner C, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, Potterat O, et al. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005;87:37-42.
- Fraune S, Bosch TCG. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(32):13146-51.
- Fukunaga Y, Kurahashi M, Tanaka K, Yanagi K, Yokota A, Harayama S. *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:343-7.
- Gao Z, Li B, Zheng C, Wang G. Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Appl Environ Microbiol* 2008;69:1-101, doi:10.1128/AEM.01315-08.
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 2007;53:187-96.
- Gomes DNF, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM, Passavante JZO. Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo" and "Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz J Biol* 2008;68(3):577-82.
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(10):3272-82.
- Gotelli NJ, Entsminger GL. In: *EcoSim: null models software for ecology*. Burlington, VT 05465: Acquired Intelligence Inc. & Kesy-Bear; 2003.
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 2001;35:305-12.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3233-41.
- Holler U, Wright AD, Matthee GF, König GM, Draeger D, Aust HJ, et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol Res* 2000;104(11):1354-65.
- Hosoya S, Yokota A. *Pseudovibrio japonicas* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1952-5.
- Jensen PR, Fenical W. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1996;17(5):346-51.
- Jensen PR, Fenical W. Secondary metabolites from marine fungi. In: Hyde KD, editor. *Fungi in marine environments*, vol. 7. Hong Kong: Fungal Diversity Press; 2002. p. 293-315.
- Jensen PR, Williams PG, Oh DC, Zeigle L, Fenical W. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 2007;1146-52.
- Kageyama A, Takahashi Y, Yasumoto-Hirose M, Kasai H, Shizuri Y, Omura S. *Janibacter corallicola* sp. nov., isolated from coral in Palau. *J Gen Appl Microbiol* 2007;53:185-9.
- Kim KH, Roh SW, Chang HW, Nam YD, Yoon JH, Jeon CO, et al. *Nocardioides basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59(1):42-7.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 1980;16:111-20.
- Klaus JS, Janse I, Heikoop JM, Sanford RA, Fouke BW. Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environ Microbiol* 2007;9(5):1291-305.
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E. *The higher fungi*. Marine mycology. New York: Academic Press; 1979 p. 690.
- König GM, Kehraus S, Seiber SF, Abdel-Lateff A, Müller D. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chem Biochem* 2006;7:229-38.
- Kurahashi M, Yokota A. *Endozoicomonas elysicola* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from the sea slug *Elysia ornata*. *Syst Appl Microbiol* 2007;30:202-6.
- Kurtboke DI. Actinophages as indicators of actinomycete taxa in marine environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005;87:19-28.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow M, Stackebrandt E, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons; 1991. p. 115-47.
- Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Frisvad JC. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep* 2005;22:672-95.
- Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:16151-6.
- Lee K, Choo YJ, Giovannoni SJ, Cho JC. *Ruegeria pelagia* sp. nov., isolated from the Sargasso Sea, Atlantic Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1815-8.
- Lee SD. *Kineococcus marinus* sp. nov., isolated from marine sediment of the coast of Jeju. *Korea Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56(6):1279-83.
- Lee SD. *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008a;58(2):500-4.
- Lee SD. *Agrococcus jejuensis* sp. nov., isolated from dried seaweed. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008b;58(10):2297-300.
- Lewbart GA. *Invertebrate medicine*. In: Ames IA, editor. Blackwell Publishing Professional; 2006.

- Lin Y, Wu X, Feng S, Jiang G, Luo J, Zhou S, et al. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast. *J Org Chem* 2001;66:6252-6.
- Maldonado LA, Stach JEM, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005;87:11-8.
- Masuma R, Yamaguchi Y, Noumi M, Omura S, Namikoshi M. Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi. *Mycoscience* 2001;42:455-9.
- Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microbial Technol* 2005;36:294-300.
- Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7019-28.
- Mitova M, Tommonaro G, Hentschel U, Müller WEG, De Rosa S. Exocellular cyclic dipeptides from a ruegeria strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. *Mar Biotechnol* 2004;6:95-103.
- Mohamed M, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT. Diversity and quorum-sensing signal production of *Proteobacteria* associated with marine sponges *Naglaa*. *Environ Microbiol* 2008;10:75-86.
- Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, Hill RT. Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005;87:29-36.
- Muramatsu Y, Uchino Y, Kasai H, Suzuki K, Nakagawa Y. *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the Alphaproteobacteria isolated in Japan and Palau. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1304-9.
- O'Donnell K. Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW, editors. *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford, CT: CAB International; 1993. p. 225-33.
- Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, Hoffmann F, Reitner J, Schumann-Kindel G. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 2001;461:55-62.
- Pimentel-Elardo SM, Tiro LP, Grozdanov L, Hentschel U. *Saccharopolyspora cebuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58(3):628-32.
- Pitt JI. In: *The genus Penicillium and its teleomorphs states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press; 1979.
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-6.
- Prasannarai K, Sridhar KR. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Curr Sci* 2001;81(3):304-11.
- Raghukumar C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity* 2008;31:19-35.
- Riesenfeld CS, Murray AE, Baker BJ. Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Syconium adareanum*. *J Nat Prod* 2008;71:1812-8.
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:355-62.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
- Salomon CE, Magarvey NA, Sherman DH. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep* 2004;21:105-21.
- Salyers AA, Whitt DD. In: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press; 1994.
- Sertan-de Guzman AA, Predicala RZ, Bernardo EB, Neilan BA, Elardo SP, Mangalidan GC, et al. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiol Lett* 2007;277(2):188-96.
- Shieh WY, Lin YT, Jean WD. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2307-12.
- Schafer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, et al. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol* 2001;34:243-53.
- Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, Ibrahim F, DeLong EF, Hutchinson CR. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissolute*. *Appl Environ Microbiol* 2005:4840-9.
- Sfanos K, Harmody D, Dang P, Ledger A, Pomponi S, McCarthy P, et al. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Syst Appl Microbiol* 2005;28:242-64.
- Shnit-Orland M, Kushmaro A. Corallimucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;67:371-80.
- Surajit D, Lyla PS, Ajmal Khan S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr Sci* 2006;90(10):1325-35.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-9.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;24:4876-82.
- Toledo-Hernández C, Zuluaga-Montero A, Bones-González A, Rodríguez AJ, Sabat AM, Bayman P. Fungi in healthy and diseased sea fans (*Gorgonia ventalina*): is *Aspergillus sydowii* always the pathogen?. *Coral Reefs* 2008;27:707-14.
- Vasconcellos SP, Crespim E, Cruz GF, Simioni KCM, Neto EVS, Marsaioli AJ, et al. Isolation, biodegradation

- ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Org Geochem* 2009;40(5): 574-88.
- Venter CJ, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen LA, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004;304: 66-74.
- Vijaykrishna D, Jeewon R, Hyde KD. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater Ascomycetes. *Fungal Diversity* 2006;23:351-90.
- Vishnivetskaya TA, Petrova MA, Urbance J, Ponder M, Moyer CL, Gilichinsky DA, et al. Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology* 2006;6(3):400-14.
- Wang G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:545-51.
- Webster NS, Hill RT. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Mar Biol* 2001;138:843-51.
- Zhang H, Lee YK, Zhang W, Lee HK. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16 S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006;90:159-69.
- Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008;93:241-8.

CAPÍTULO 2

TAXONOMIA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTE MARINHO

2.1. INTRODUÇÃO

A taxonomia dos actinomicetos é bastante complexa, começando pela morfologia da colônia que dependendo do *taxon* pode se apresentar como cocos ou bastonetes filamentosos ou, como um micélio estável constituído de filamentos ramificados ou hifas, além disso, podem apresentar esporos móveis ou imóveis (LECHEVALIER, 1994). Esta riqueza de formas foi usada inicialmente para justificar a separação do grupo actinomicetos de micro-organismos morfológicamente simples dentro do domínio Bactéria (EMBLEY; STACKEBRANT, 1994).

Diversas técnicas moleculares, baseados nas análises de sequências de DNA, têm sido utilizadas para a taxonomia e caracterização de espécies de actinobactérias. A principal é a análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S. Entretanto, quando as análises desse gene não são elucidativas para a diferenciação de espécies devido à baixa variabilidade encontrada na sequência do gene (GUO et al., 2008), análises combinadas de vários genes *housekeeping*, originária da estratégia denominada *Multilocus Sequence Typing* (MLST), têm sido utilizadas com sucesso na sistemática microbiana para elucidar as relações taxonômicas entre as espécies (CHRISTENSEN et al., 2004; RIVAS et al., 2009).

A partir do MLST surgiu o MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), onde as sequências são comparadas por similaridade e as análises filogenéticas são feitas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Assim, MLSA é mais adequado para separação de espécies enquanto MLST é mais apropriado para estudo de diversidade (CHRISTENSEN et al., 2007).

A análise de genes *housekeeping* tem se mostrado útil para a classificação, identificação e diferenciação de espécies estreitamente relacionadas com sequências de genes RNA ribossomal 16S quase idênticas, além de um eficiente método de triagem para delimitação de novos táxons (NASER et al., 2005). Brady et al. (2008) revelaram que os genes *housekeeping gyrB*, *rpoB*, *atpD* e *infB*, foram confiáveis marcadores genéticos para a diferenciação de espécies de *Pantoea*. MLSA não só distinguiu entre as sete espécies de *Pantoea* validamente publicadas, como também sugeriu potencial existência de dez novas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Menezes (2009) para isolados de *Chromobacterium* sp., as análises de MLSA e do gene RNA ribossomal 16S, sugeriram nova espécie para o gênero, o que foi confirmada pela hibridação DNA-DNA.

Por conseguinte, as análises com base no gene RNA ribossomal 16S são mais rápidas e precisas para a identificação de procariontes desconhecidos, incluindo o reconhecimento de novas espécies (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010). Entretanto a hibridação DNA-DNA é obrigatória quando as sequências do gene 16S ribossomal apresentam > 99% de similaridade (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

Por outro lado, a quimiotaxonomia, ou seja, análise da distribuição de macromoléculas, tais como aminoácidos, lípidos (ácidos graxos, ácidos micólicos e lípidos polares), polissacáridos e polímeros (açúcares de parede e ácidos teicóico) relacionados, proteínas e quinonas isoprenoides entre membros de diferentes famílias, é utilizada para a classificação e identificação das actinobactérias (GOODFELLOW; O'DONNELL, 1994; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009). Recentemente, análises de proteínas utilizando electroforese de sódio dodecil sulfato de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE;. (LANOOT et al, 2002) e de matriz assistida por desorção a laser / ionização-tempo de voo (MALDI TOF;. SIEGRIST et al, 2007) têm fornecido informações valiosas para a classificação de diversas bactérias, incluindo os actinomicetes em geral. Congruência entre a distribuição descontínua de marcadores químicos e as análises com base nas sequências do gene RNA ribossomal 16S têm sido relatadas (CHUN; GOODFELLOW, 1995; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; WARD; GOODFELLOW, 2004).

Ainda, informações de testes bioquímicos (utilização de açúcares como fonte de carbono, degradação de compostos, atividade enzimática) e fenotípicos (características de crescimento, pH, salinidade), complementam a classificação e identificação das espécies. Em caso de espécies novas, esses dados são necessários para a descrição de novos taxons.

Nesse capítulo taxonomia polifásica foi utilizada para a classificação e identificação dos isolados de actinobactéria obtidos a partir dos macro-organismos marinhos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

As linhagens utilizadas neste estudo consistem de 569 bactérias isoladas a partir de água do mar e macro-organismos marinhos coletados no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil.

A primeira coleta foi realizada em janeiro de 2006, em São Sebastião, São Paulo, Brasil, e foram isoladas 351 bactérias as quais foram objeto de estudo de diversidade microbiana associada a macroorganismos marinhos relatada no Capítulo 1 (MENEZES et al, 2010). Destas 59 isolados foram identificados como actinobactérias e selecionadas para investigação do potencial biotecnológico quanto às atividades antimicrobiana e antiviral e descrição de novas espécies.

Em dezembro de 2008 foi realizada a segunda coleta de macro-organismos, na Ilha de Búzios (23° 47' 371" sul; 45° 08' 771" oeste), Costa do Aquário, região da Ilha de Búzios (23° 47' 759" sul; 45° 09' 380" oeste), Praia Saco do Poço (23° 45' 32" sul; 45° 15' 8" oeste), Parcel da Coroa (23° 47' 260" sul; 45° 08' 696" oeste), Ilha de Serraria (23° 48' 39" sul, 45° 13' 45" oeste), todos no município de Ilhabela, São Paulo, Brasil, e foram isoladas 226 bactérias. As amostras obtidas nesta coleta foram: seis esponjas marinhas, sendo um representante da espécie *Petronica citrina*, um representante da espécie *Chelonaplyela erecta*, um representante da espécie *Axinella corrugata* e três da espécie *Dragnacidon reticulata*; duas estrelas do mar, sendo uma da espécie *Echinaster brasiliensis* e outra um representante da família *Ophidiasteridae*; uma alga verde da espécie *Codium intertextum* e um nudibrânquio (lesma do mar) da espécie *Tambja* sp. Também foram isoladas bactérias diretamente de amostra da água do mar.

O isolamento das bactérias se deu após a lavagem dos macro-organismos com água do mar artificial esterilizada (ASW) (MENEZES et al, 2010). Em seguida, os macro-organismos foram triturados e diluições seriadas (10^{-2} e 10^{-4}) foram semeadas nos meios de cultivo: M1 (10 g de amido solúvel; 4 g de extrato de levedura; 2 g de peptona; 18 g de Agar; 1.000 mL ASW); Agar Marinho MA (Marine Agar, Difco Manual, 1998); TSA (Tryptic Soy Agar, Difco Manual, 1998); AA (20 g de Agar e 1.000 mL de ASW) e ISP2 (4 g de extrato de levedura; 10 g de extrato de malte; 4 g de glicose; 20 g de Agar; 1.000 mL de ASW e pH aproximado de 7,3). Foram adicionados actidiona (50 ppm) e ácido nalidíxico (15 ppm) nos meios de cultivo para isolamento, com intuito de inibir o crescimento de fungos. A água do mar foi semeada diretamente nos mesmos meios de cultivo e condições de isolamento. Todas as placas foram mantidas em temperatura ambiente e o crescimento de colônias foi acompanhado diariamente. As colônias distintas foram purificadas no mesmo meio de crescimento e preservadas pelo método de ultracongelamento (- 80 °C), em glicerol 20 % (HUNTER-CEVERA; BELT, 1996).

2.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As bactérias foram reativadas nos respectivos meios de cultivo utilizados no isolamento (Tabela S1 e S3, Apêndices II e IV), preparados com solução de água do mar artificial (ASW). A avaliação das características morfológicas foi realizada por microscopia ótica para a separação dos isolados em grupos de acordo com a forma da célula e coloração de Gram. Os isolados pertencentes ao grupo dos Gram-positivos foram selecionados para investigação do potencial biotecnológico quanto às atividades antimicrobiana e antiviral e descrição de novas espécies (Tabela S3, Apêndice IV).

2.2.3. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

2.2.3.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Os isolados preservados e caracterizados como Gram-positivos e os 59 actinomicetos, previamente identificados (MENEZES et al., 2010), foram reativados em 5 mL de meio de cultivo de isolamento (Tabela S1 e S3, Apêndices II e IV) e incubados a 28 °C por 24 h, a 150 rpm. O crescimento bacteriano foi coletado por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min para extração de DNA genômico em pequena escala, segundo o método descrito por Van Soolinger et al. (1993) modificado.

Os sedimentos foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM em pH 8,0), centrifugados a 12.000 rpm e o sobrenadante descartado. Novamente o sedimento foi ressuspensionado em 400 µL de TE 1X contendo 5 µL de lisozima (100 mg/mL), os tubos foram agitados brevemente com utilização de vórtex e incubados a 37 °C por 60 min. Após este período foram adicionados 67,5 µL de SDS 10 % e 4 µL de proteinase K (10 mg/mL), ambas as soluções pré-aquecidas a 65 °C. Os tubos foram agitados rapidamente no vórtex e incubados a 65 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL da solução CTAB/NaCl (NaCl 4,1 %, CTAB 10 %), ambas pré-aquecidas a 65 °C. Os tubos foram agitados no vórtex até que a suspensão apresentasse o aspecto de um líquido leitoso e incubados a 65°C por 10 min. Após a incubação 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionadas à suspensão e os tubos agitados no vórtex por 10 s e centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e o DNA precipitado

com 0,6 volumes de isopropanol (~ 450 µL). Os tubos foram invertidos por várias vezes a fim de misturar as soluções ou até visualizar um precipitado fibroso branco. Em seguida, os tubos foram mantidos a -20 °C por 30-60 min e centrifugados a 7.000 rpm por 5 min. O DNA foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 70 % gelado e centrifugados a 7.000 rpm por 5 min entre as lavagens. O DNA genômico foi mantido em estufa a 37 °C para secagem, e ressuspenso em 80 µL de água ultrapura esterilizada. Foram adicionados 10 µL de RNase e incubados por 1 h a 37 °C, e estocados a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado através da comparação do DNA λ em diferentes concentrações em gel de agarose a 0,8 % corado 2 % de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) submetido a eletroforese por 30 min em condição de 5 V/cm.

2.2.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE 23S COM PRIMERS GRUPO-ESPECÍFICO

A seleção dos isolados de actinobactérias foi feita através de amplificação do gene RNA ribossomal 16S utilizando 2 conjuntos de *primers* específicos descritos na literatura. Os *primers* grupo-específicos, Act_F (SCAct235S20: 5' CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG 3') e Act_R (SCAct878A19: 5' CCG TAC TCC CCA GGC GGG G 3'), foram utilizados para amplificar um fragmento específico de actinobactérias segundo protocolo de Stach e colaboradores (2003) e os *primers* grupo-específicos, 231nsV (5'- ADG CGT AGN CGA WGG- 3') e 23InsR (5'-GTG WCG GTT TNB GGT A-3') descritos por Roller, Ludwig e Schleifer (1992).

As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler® gradient (Eppendorf®) nas seguintes condições de reação: 0,4 µM de cada *primer* específico, 1 mM tampão 10X, 0,2 µM dNTP's, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL de reação. Para a amplificação com os primers 231nsV e 23InsR as condições de reação foram: 33 ciclos a 95 °C por 1 min, 52 °C por 2 min e 72 °C por 3 min; com uma extensão final de 72 °C por 5 min. Para os primers Act_F e Act_R as condições de reação foram: desnaturação inicial de 95 °C 4 min, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 30 s e 70 °C por 1 min.

Os *primers* grupo-específicos desenhados por Stach e colaboradores (2003) e por Roller, Ludwig e Schleifer (1992) foram testados frente a bactérias pertencentes a outros grupos taxonômicos como Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, além de representantes do

Filo Actinobacteria (Tabela S2, Apêndice III), buscando avaliar a especificidade do par de *primers*.

Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene RNA ribossomal 16S e do gene RNA ribossomal 23S foram confirmados em géis de agarose 1,2 % e 2,5%, respectivamente, conforme descrito anteriormente.

2.2.3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA COM BASE NO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S

Os isolados de actinobactérias foram identificados através do sequenciamento parcial do gene RNA ribossomal 16S. Foram utilizados, para amplificação do gene, os *primers* 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') (LANE, 1991) e usando o primer 1525r (5' AAGGAGGTGWTCCARCC 3'; LANE, 1991) ao invés do primer 1401r (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997) homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.

As seguintes condições foram utilizadas na reação de amplificação do gene RNA ribossomal 16S: 0,4 µM de cada *primer* específico, 1 mM tampão 10X, 0,2 µM dNTP's, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos sendo: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, extensão final de 3 min a 72°C, em termociclador *Eppendorf*. O tamanho dos produtos de PCR foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1,2 %, conforme descrito anteriormente.

Para o sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S foram utilizados os *primers*: 28f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'); 1100r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3') (LANE, 1991); 765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3') (STACKEBRANDT et al, 1990); 782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3') (CHUN, 1995), 1401r (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997) e 1525r (5' AAGGAGGTGWTCCARCC 3'; LANE, 1991). Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se mini-colunas (*GFX PCR DNA e gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi constituída de 2 µL de DNA (aproximadamente 10 ng de DNA), 1 µL de um único primer (5 pM), 2 µL tampão Save Money (500 µL de MgCl₂ 50mM e 1mL de Tris-HCl 1M pH 9,0), 2 µL

do reagente “Bid Dye” (Applied Biosystems) e água qsp 10 µL. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 96°C durante 2 min, seguida de 30 ciclos, sendo cada ciclo constituído das etapas de desnaturação (96°C, 45 seg), pareamento (50°C, 30 seg) e extensão (60°C, 4 min). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Posteriormente, as reações de sequenciamento foram precipitadas, suspensas no tampão de corrida apropriado para cada sistema (10 µL do tampão formamida para o sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystems).

As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997) com as sequências das linhagens tipos mais próximas obtidas no banco de dados EzTaxon-e (KIM et al., 2012). As árvores filogenéticas foram inferidas usando os algoritmos evolutivos máxima-verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981), máxima-parsimônia (FITCH, 1971) e Neighbour-Joining (SAITOU; NEI, 1987), usando o programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013); a matriz de distância para a análise Neighbor-Joining foi gerada usando o modelo Jukes e Cantor (1969). As topologias das árvores foram avaliadas baseado em 1.000 replicatas (Felsenstein 1985) usando o programa MEGA versão 6. Como grupo externo foram utilizadas as sequências das linhagens Tipos *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354).

2.2.4. TAXONOMIA POLIFÁSICA PARA DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES

2.2.4.1. MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)

A caracterização da diversidade genética dos isolados de actinomicetos foi realizada por MLSA utilizando amplificação e sequenciamento de genes conservados. Foram selecionados cinco genes (Tabela 1) com diferentes taxas de evolução a partir da comparação de genomas completos de micro-organismos com proximidade filogenética com os gêneros *Williamsia*, *Marmoricola*, *Janibacter*, *Kineococcus*, *Curtobacterium* e *Knoellia*. Os microrganismos selecionados foram *Kineococcus radiotolerans* SRS30216 (CP00075.0), *Nocardioides* sp. JS614 (CP000509.1), *Nocardia farcinica* IFM10152 (NC_006361.1).

Primers foram desenhados a partir de regiões conservadas usando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) (Rozen, Skaletsky, 2000). Para cada gene

selecionado foram desenhados *primers forward* e *reverse* de modo a obter produtos amplificados de aproximadamente 800 a 1.100 pb (Tabela 1).

As sequências dos genes selecionados foram alinhadas no programa CLUSTAL X juntamente com as sequências dos genes dos seguintes micro-organismos, para avaliação dos *primers* escolhidos: *Jonesia denitrificans* DSM20603 (CP001706.1), *Kocuria rhizophila* DC2201 (NC_010617.1), *Micrococcus luteus* NCTC2665 (NC_012803.1), *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190 (NC_015312.1), *Rhodococcus erythropolis* PR4 (NC_012490.1), *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (NC_009142.1), *Salinispora arenicola* CNS-205 (CP000850.1), *Streptomyces coelicolor* A3 (NC_003888.3), *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC13350 (NC_010572.1) e *Streptomyces violaceusniger* Tu4113 (CP002994.1).

Tabela 1. Genes conservados selecionados para análise de MLSA.

Gene	Função	Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
<i>rpoA</i>	RNA polymerase alfa subunit	<i>rpoAF</i>	5' GBTACACCCTCGGCAACTC 3'	850-950
		<i>rpoAR</i>	5' AGCTTBACCTTCACCTCGTC 3'	
<i>recA</i>	DNA recombination protein	<i>recAF</i>	5' ANAANCAGTTCGGCAAGG 3'	900-950
		<i>recAR</i>	5' GCSATCTTGTTCTTSACSAC 3'	
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	<i>gyrBF</i>	5' GBAAGCGNCCBGGTATGTAC 3'	900-950
		<i>gyrBR</i>	5' GTCTGVCCCTCGAACTGSGGNT 3'	
<i>trpB</i>	tryptophan synthase beta subunit	<i>trpBF</i>	5' BTCNCACAAGATCAAHAACG 3'	850-950
		<i>trpBR</i>	5' TCGATSGCSGGVATGATGCC 3'	
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta subunit	<i>rpoBF</i>	5' TTCATGGACCAGAACAACC 3'	950-1.000
		<i>rpoBR</i>	5' CGTAGTTGTGACCCTCCC 3'	

Reações de PCR para amplificação dos genes conservados foram feitas usando 0,4 µM de cada *primer* específico citado na Tabela 1, 1 mM tampão 10X, 0,2 mM dNTP's, , 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen), e 50-100 ng de DNA, em um volume final de 50 µL de reação. As condições de reação foram: desnaturação 94 °C/5 min; 10 ciclos de desnaturação 94 °C/1 min, anelamento 60 °C (*recA*, *rpoA*, *rpoB*, *trpB*) e 65 °C (*gyrB*) /30 s, com decréscimo de 0,5 °C a cada ciclo, e extensão 72 °C/2 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação 94 °C/1 min, anelamento 55 °C (*recA*, *rpoA*, *rpoB*, *trpB*) e 60 °C (*gyrB*) /30 s e extensão 72 °C/2 min, e extensão final de 72 °C/10 min, em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®).

Os produtos amplificados foram purificados e quantificados em gel de agarose 1,2 % contendo 2 % de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems), conforme descrito acima anteriormente (item 2.2.3.3.).

Os *primers* utilizados no sequenciamento dos genes conservados foram os mesmos usados na amplificação. As temperaturas de anelamento utilizadas no sequenciamento foram de 60 °C para o gene *gyrB* e 50 °C para os demais genes. As sequências foram alinhadas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), e ambas as extremidades de cada alinhamento cortadas para tamanhos fixos de nucleotídeos (YOUNG et al., 2008). As sequências de cada gene foram concatenadas formando uma sequência única com um comprimento total de nucleotídeos variando para cada gênero e dos genes concatenados. As sequências concatenadas dos isolados foram comparadas utilizando o programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Jukes-Cantor (1969) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens (FELSENSTEIN, 1985).

2.2.4.2. HIBRIDAÇÃO DNA-DNA

Os ensaios de hibridação DNA-DNA foram feitos com os isolados B175 (*Knoellia* sp.), B374 (*Marmoricola* sp.), B138, B375 e B452 (*Williamsia* sp.), B736 (*Serinicoccus* sp.), B742 (*Janibacter* sp.), B204 (*Gordonia* sp.) e B366 (*Kineococcus* sp.), considerados possíveis novas espécies.

Inicialmente a hibridação DNA-DNA foi realizada por marcação com sonda não radioativa conforme descrito por Gonçalves e Rosato (2000), em colaboração com a Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, entretanto esta metodologia mostrou-se muito laboriosa e foi substituída pela hibridação DNA-DNA baseada na determinação fluorimétrica do parâmetro ΔT_m entre as espécies relacionadas, descrita por Gonzalez e Saiz-Jimenez (2005).

Antes dos ensaios de ΔT_m , é necessária a obtenção da temperatura ótima de renaturação (T_{or}), obtida a partir do conteúdo de GC, obtido também por desnaturação térmica. As variações fluorimétricas da desnaturação do DNA foram determinadas em plataforma de PCR em tempo real (rtPCR) (GONZALEZ; SAIZ-JIMENEZ, 2002; DE LEY; CATTOIR; REYNAERTS, 1970) na presença do fluoróforo SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies).

2.2.4.3. DETERMINAÇÃO DO ΔT_m ENTRE AS ESPÉCIES EM PLATAFORMA DE RT-PCR

O DNA genômico híbrido foi obtido com a adição de cada DNA (2,5 μ g) da linhagem tipo e da linhagem teste, enquanto que o controle, foi composto por 5,0 μ g de DNA da linhagem teste. O DNA genômico foi suspenso 90 μ L de tampão SSC 0,1X (pH 8,0) (Anexo 2).

Os DNAs controle homólogos e amostras de DNA híbridos foram desnaturados e re-hibridizados, em termociclador (Thermal Cycler 96 Well Veriti) de acordo com as seguintes condições: Desnaturação a 99 °C por 10 min, T_{or} (equação 2) por 8 h, seguida de ciclos de 1 h com diminuição de 10 °C/ciclo ($T_{or} - 10$ °C, $T_{or} - 20$ °C), até atingir 25 °C / 1h, e manutenção a 4°C. Em seguida, foram adicionados 10 μ l de SYBR Green 1X à reação, misturados muito bem, e transferidos 30 μ l para 3 poços da placa ABI prism optical reaction plates (Applied Biosystems). Desnaturação termal foi realizada nas seguintes condições: 25 °C por 15 min, seguida de rampa termal de 25 a 99,8 °C, com aumento de 0,2 °C por segundo, em *Real Time 48 Wells PCR Systems StepOne* (Applied Biosystems). A medida de fluorescência foi feita a cada intervalo da rampa.

A T_m (temperatura de *melting*) das amostras foi calculada tomando a temperatura correspondente à diminuição de 50% da fluorescência na curva de *melting* de fluorescência em função da temperatura. A ΔT_m é a diferença entre as T_m dos DNAs homólogos e heterólogos, onde $\Delta T_m > 5$ °C indicam diferentes espécies (WAYNE et al., 1987; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

2.2.4.4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GC E DA TEMPERATURA ÓTIMA DE RENATURAÇÃO (TOR)

O conteúdo de GC foi determinado fluorimetricamente, conforme descrito por De Ley, Cattoir e Reynaerts (1970). O DNA genômico (2,5 µg) seco em speed vac SPD 121P, foi suspenso em 90 µL de solução de tampão citrato com formamida (30% formamida, SSC 0,1X pH 8,0) e dividido em três alíquotas as quais foram aplicadas nos poços da placa ABI prism optical reaction plates (Applied Biosystems), após a adição de 10 µL de SYBR Green 1X (Invitrogen). A desnaturação térmica a 1 °C/min, com medida da fluorescência a cada intervalo, foi realizada durante toda a rampa de desnaturação conduzida de 25 a 99,8 °C, em plataforma de rtPCR StepOne (Applied Biosystems). A temperatura média da desnaturação térmica do DNA TM é a temperatura na qual 50 % do DNAfd encontra-se desnaturado e a T_m foi obtida com auxílio do StepOne Software v2.0.

O conteúdo de GC foi calculado a partir da equação 1, descrita abaixo (GONZALEZ; SAINT-GIMENEZ, 2002),

$$\text{mol\% G+C} = (199 - m) - 71.08 \quad (1)$$

Em seguida, obtidos os valores de %GC foi determinada a temperatura ótima de renaturação (Tor) usando a equação 2 (DE LEY, CATTOIR; REYNAERTS, 1970),

$$\text{Tor} = 0.51(\text{mol \% G+C}) + 47.0 \quad (2)$$

2.2.4.5. TESTES QUIMIOTAXONÔMICOS

Os perfis quimiotaxonômicos das possíveis novas espécies foram obtidos a partir da determinação dos isômeros do ácido diaminopimélico (A2pm) (STANECK; ROBERTS, 1974), quinonas isoprenóides (COLLINS, 1994; GROTH et al., 1996), determinação de ácido murâmico (UCHIDA et al., 1999), lipídios polares (MINNIKIN et al., 1984) e açúcares totais de parede, usando controles apropriados (SCHAAL, 1985) e foram feitas em colaboração com o Dr. Tiago Domingues Zucchi pesquisador colaborador no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente/ Jaguariúna. Ácidos graxos foram extraídos, metilados e analisados por cromatografia gasosa usando o sistema Sherlock MIDI (SASSER, 1990) em colaboração com o Dr. Itamar Soares de Melo, pesquisador do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente/ Jaguariúna.

2.2.4.5.1. PREPARO DO INOCULO

Os isolados de actinomicetos foram inoculados em 500 mL meio GY (Glicose-Extrato de levedura) e incubados a 28 °C por 1 semana com agitação (100 rpm). Em seguida uma alíquota (10 mL) foi centrifugada e a massa celular suspensa em solução de NaCl 0,8 % foi utilizada nos testes bioquímicos. O restante do cultivo foi centrifugado e liofilizado para obtenção de biomassa seca para utilização nos testes quimiotaxonômicos, exceto para o FAME cujo repique foi realizado em meio TSA.

2.2.4.5.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME)

Os ácidos graxos foram obtidos conforme a metodologia descrita no manual do equipamento MIDI (SASSER, 1990; SCHUTTER; DICK, 2000).

Os isolados foram repicados, em Trypticase Soy Agar (TSA; Oxoid), e mantidos a 28 °C por 48 h. O repique foi feito na forma de esgotamento em quatro quadrantes, conforme descrito por Sasser (1990). As células bacterianas (80 mg), coletadas a seco, com alça de metal, a partir do terceiro quadrante, foram transferidas para tubo de cultura para extração e conversão dos ácidos graxos presentes na parede celular ou nas frações de membrana a ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES).

A extração consistiu de quatro etapas: saponificação, metilação, extração e lavagem alcalina (SASSER, 1990; SCHUTTER; DICK, 2000). Um controle negativo (branco) e um controle positivo (*Bacillus sphaericus*) foram extraídos simultaneamente, como recomendado no manual do sistema MIDI.

Aos tubos foram adicionados 1 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (15% [m/v] NaOH em 50% [v/v] metanol), para saponificação das amostras. Os tubos foram lacrados com tampas revestidas com teflon, agitados em vortex durante 10 s, incubados a 100 °C por 5 min, resfriados à temperatura ambiente, agitados por 10 s e incubados a 100 °C por mais 25 min. Nessa etapa (aquecimento e adição de base forte) ocorre a lise da célula e liberação dos ácidos graxos dos lipídios celulares que são convertidos a sais de sódio. Os tubos foram resfriados e foram adicionados 2 mL do reagente de metilação (3,25 mol/L HCl em 46% [v/v] metanol) e submetidos a vortex por 5 s, incubados a 80 °C por 10 min e

resfriados à temperatura ambiente. Os ácidos graxos foram extraídos das amostras com 1,25 mL terc-butil metil éter: hexano (1:1, v/v) e os tubos mantidos em rotator clínico (Fisher Scientific) por 10 min. A fase aquosa (inferior) foi transferida para um novo tubo, com auxílio de pipeta Pasteur, e foram adicionados 3 mL do reagente de lavagem (NaOH 1,2% m/v). Os tubos foram invertidos por 5 min em rotator clínico e centrifugados por 3 min a 3.000 rpm. Cerca de 2/3 da fase orgânica (superior) foram transferidas para um tubo específico para o cromatógrafo gasoso.

A análise dos FAMES foi realizada no cromatógrafo a gás Agilent 6850 com injetor automático, série 7683 (250 °C) e detector de ionização de chama (300 °C) (Flame Ionization Detector FID), (Hewlett-Packard) equipado com coluna capilar (25 m x 2 mm x 0,33 µm). Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (0,4 mL/min). As amostras foram injetadas (2µL) automaticamente no modo split (liner 19251-60540). O tempo de corrida foi de 25 min com o seguinte programa de temperatura do forno: 170 °C a 260 °C (5 °C/min) t= 18 min; 40 °C/ min até 310 °C e mantém por 1,5 min. O nitrogênio foi utilizado como gás “make up” e ar para manter a chama do detector de ionização de chama.

O perfil de ácidos graxos (FAMES) dos isolados de actinomicetos foi gerado pelo programa Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Inc.), baseado nos tempos de retenção da corrida de calibração. A identificação foi feita por comparação do perfil gerado com os perfis de espécies conhecidas presentes no banco de dados ACTINO versão 5 (Microbial ID, Newark, NJ, USA).

2.2.4.5.3. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS MURÂMICOS

A determinação de ácidos murâmicos dos actinomicetos foi realizada em colaboração com o Dr. Tiago Domingues Zuchi, pesquisador colaborador no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente/ Jaguariúna. O tipo do N-acil dos ácidos murâmicos do peptidoglicano da parede celular dos isolados foi determinado de acordo metodologia descrita por Uchida et al. (1999).

A biomassa seca (1 mg) de cada isolado foi hidrolisada com 100 µL de HCl 6N a 100 °C por 2 h, e resfriada a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada 1 mL de água saturada com éter dietílico (1:1, agitar bem e utilizar a fase superior), agitada em vortex por 1 min e centrifugada por 2 min a 12.000 rpm. A fase superior foi transferida para outro tubo.

Repetiu-se a adição de mais 1 mL de água saturada até a transferência da fase superior para o novo tubo.

O extrato foi tratado com 2 µL de NaOH 0,1 N, agitado por inversão e evaporado sob gás nitrogênio. Foi adicionado 25 µL de água destilada e 500 µL de reagente DON (0,02 % de 2,7-dihidroxi-naftaleno em H₂SO₄), recém preparado, incubado a 100 °C por 10 min e resfriado a temperatura ambiente. Antes de avaliar o resultado, os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 5 min. O ácido murâmico N-acetilado apresenta coloração amarelo claro ou pálido, e N-glicosilado apresenta coloração vermelho a violeta.

2.2.4.5.4. EXTRAÇÃO DE MENAQUINONAS E LIPÍDEOS POLARES

Menaquinonas foram extraídas conforme metodologia em pequena escala descrita por Collins et al. (1985, 1994).

A biomassa seca (50 mg) foi suspensa em 2 mL de NaCl 0,3 %: metanol (1:10), em tubo com tampa de rosca, protegido com veda-rosca, e envolto com papel alumínio. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min, mantidas por 5 min a 37 °C, e resfriadas a temperatura ambiente. Foram adicionados 2 mL de éter de petróleo, mantido em agitador de tubos por 15 min e centrifugados por 5 min a 2.000 g (5.000 rpm). A fase superior foi transferida para vial e a extração repetida com a adição de mais 1 mL de éter de petróleo à fase inferior, repetindo os procedimentos acima. Após a transferência dos extratos para os vials, foram evaporados sob nitrogênio.

As menaquinonas extraídas foram suspensas em 200 µL de isopropanol, filtradas em membrana 0,22 µm, e analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC, LC-10AS, Shimadzu 63 Co), equipado com coluna de fase reversa C18 (250 × 4.0 mm, 5 µm tamanho partícula; coluna RP-18-Lichrosorb; Capital Analytical, UK), Metanol/Isopropanol (2:1, v/v) foi usado como fase móvel isocrática com taxa de fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente. Menaquinonas foram detectadas em comprimento de onda de 270 nm com detector de UV (SPD-10^a, Shimadzu Co.). Volume de amostra injetado foi de 10 µL. As menaquinonas foram identificadas de acordo com o tempo de retenção comparado a tempo de retenção de amostras de referências.

Os lipídios polares foram extraídos a partir da biomassa remanescente (fase inferior) da extração das menaquinonas (COLLINS et al., 1985). À fase inferior foram adicionados 2,3 mL

de clorofórmio: metanol:NaCl 0,3% (90:100:30, v/v), mantidos no agitador de tubos por 1 h, centrifugados por 5 min a 2.000 g e sobrenadante transferido para outro tubo. À mistura foram adicionados 0,75 mL de clorofórmio:metanol:NaCl 0,3% (50:100:40, v/v), mantidos no agitador de tubos por 30 min, centrifugados por 5 min a 2.000 g e sobrenadante transferido para o tubo. Repetiu-se essa extração a partir da adição dos 0,75 mL de clorofórmio: metanol:NaCl 0,3% (50:100:40, v/v). À mistura dos sobrenadantes foram adicionados 1,3 mL de clorofórmio e 1,3 mL de NaCl 0,3%, amostras foram agitadas em vortex por 1 min e centrifugadas por 5 min a 2.000 g. A fase inferior, contendo os lipídios polares extraídos, foi transferida para vial e evaporada sob nitrogênio e e stocada a – 20 °C.

Os extratos lipídicos secos foram dissolvidos em 80 µL de clorofórmio-metanol (2:1) e 20 µL foram aplicados em placas de sílica gel para cromatografia de camada delgada (TLC) (Merck Co, 1.05554), após pré-corrída em clorofórmio:metanol:água (32,5:12,5:2), a temperatura constante, e após secagem a temperatura ambiente por 15 min.

A primeira corrida (direção 1) foi com a mesma mistura de solventes utilizada na pré-corrída, após pré-corrída a placa foi mantida a temperatura ambiente por 30 min para secagem. Assim, a placa foi invertida para a direita, para a segunda corrida (direção 2), com a mistura de solventes clorofórmio:ácido acético:metanol:água (40:7,5:6:2) e, em seguida, mantida a temperatura ambiente para secagem.

A revelação das placas TLC foi obtida borrifando a solução de ninidrina 0,2% (Sigma N-0507) em etanol e aquecendo a mesma a 110 °C por 5 min para a detecção dos lipídios com grupos aminas livres (amino-lipídios). PE (fosfatidiletanolamina) e PME (fosfatidilmetiletanolamina) aparecem como pontos rosa escuro em fundo claro. Em seguida, foi borrifado o reagente de Dittmer's (solução de azul de molibdênio, Sigma M-3389), para detecção dos fosfolipídios, que aparecem como pontos azuis em fundo claro.

2.2.4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os isolados de actinomicetos a serem descritos como novas espécies foram inoculados nos meios de cultivo sólidos: extrato de levedura e triptona (ISP1), extrato levedura e malte (ISP2), extrato de aveia (ISP3), amido com sais inorgânicos (ISP4), asparagina e glicerol (ISP5) e tirosina agar (ISP7) (Anexo 2). As placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) e as características de crescimento, tais como, coloração

micelial, reversa e pigmentos difundíveis foram avaliadas no período. Também foi avaliada a capacidade dos isolados em crescer nos meios, ágar nutriente (NA, Oxoid) e ágar tripticase soja (TSA, Oxoid) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

As propriedades micromorfológicas das células foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, a partir de culturas com 3 dias de incubação, em meio GYA (Glicerol-extrato de levedura-ágar) a 30 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em solução de NaCl 0,9 %, então 10 µL foram colocadas nos “grids” (grades de cobre com malha 300 com filme de carbono, CF300-Cu), excesso foi tirado com papel filtro e mantidas em descanso por 10 min. O material foi corado negativamente com a adição de 1 gota de ácido fosfotúngstico a 2 %, por 2 min, e o excesso retirado com papel de filtro. As telas foram mantidas por 30 min a temperatura ambiente, em placa de Petri, para secagem (LEE; LEE, 2010, modificado). Em seguida, foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo LEO906 (Zeiss).

2.2.4.7. TESTES BIOQUÍMICOS

2.2.4.7.1. TESTES DE DEGRADAÇÃO

Os meios de cultura utilizados para os testes de degradação estão descritos no Anexo 2. A degradação de fontes de carbono foi realizada em meio Bennett's agar modificado (Jones, 1949), o qual foi suplementado separadamente com Ácido úrico (0,5%), celulose (1%), caseína (0,5%), guanina (0,4%), hipoxantina (0,4%), pectina (0,4%), amido (0,1%), xantina (0,4%), xilano (0,4%).

O teste de degradação de Tween foi realizado em meio Sierra's (SIERRA, 1957) suplementado com 1% (v/v) de Tween 20, 40, 60 e 80 cada.

A avaliação de degradação de gelatina (0,4%) foi feita em meio Gordon conforme descrito por Gordon et al. (1974). A suspensão bacteriana em solução de NaCl 0,8 % foi inoculada, em cada placa (10 µL), e estas foram incubadas por 14 dias a 28 °C e a degradação do composto foi avaliada pela formação dos halos de degradação após 2 min da adição de solução de lugol/iodina (Anexo 1).

2.2.4.7.2. PERFIL METABÓLICO DE FONTES DE CARBONO

A habilidade dos isolados em utilizar diferentes compostos de carbono como fontes únicas de carbono para energia e crescimento foi avaliada utilizando meio basal mínimo ISP9 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) (Anexo 3) suplementado com os açúcares adonitol, arabinose, α -lactose, celubiose, dextrina, frutose, galactose, glicerol, glicogênio, maltose, manitol, meso-eritritol, inositol, sorbitol, xilose, rafinose, ramanose e ribose na concentração de 1 %. Além disso, os compostos ácido láctico, ácido málico e ácido oxálico foram utilizados como fonte de carbono na concentração de 0,2 %.

O perfil metabólico de carbono foi feito em microplacas de 24 poços. Uma alíquota com 10 μ L da suspensão bacteriana em solução de NaCl 0,8% foi inoculada em cada poço contendo uma única fonte de carbono. As microplacas foram incubadas por 14 dias a 28 °C e o resultado foi considerado positivo quando houve crescimento do actinomiceto.

2.2.4.7.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática dos isolados foi avaliada usando o kit API ZYM (BioMérieux) para a detecção de 19 reações enzimáticas. O kit consiste de 20 cúpulas, sendo uma o controle e as outras 19 contendo o substrato enzimático sintético.

O teste consiste na inoculação de 65 μ L da suspensão salina em NaCl dos isolados de actinomicetos em cada cúpula, seguida de incubação a 37 °C por 4 h e leitura do resultado foi realizada conforme as instruções do fabricante. As atividades enzimáticas são detectadas por meio de reações colorimétricas após a adição uma gota dos reagentes ZYM A e ZYM B, conforme as instruções do fabricante. A alteração na coloração do meio indica o resultado positivo para atividade enzimática conforme comparação com o protocolo do fabricante.

2.2.4.8. TESTES DE TOLERÂNCIA

As linhagens de actinomicetos foram avaliadas com relação à capacidade de crescerem em diferentes temperaturas, pHs, NaCl e antibióticos.

- **Temperatura:** crescerem nas temperaturas de 10, 28, 37 e 45 °C em meio GYA (GORDON; MIHM, 1962).

- **pH:** crescerem em pH 4,0, 5,0, 9,0 e 10,0, em meio ágar tampão fosfato para teste tolerância a pH (Anexo 2).
- **Cloreto de sódio:** crescerem nas concentrações 1, 2, 5 e 7% de cloreto de sódio (NaCl), em meio GYA (GORDON; MIHM, 1962).
- **Resistência a antibióticos:** crescerem em meio GYA, na presença dos diferentes antibióticos, ácido nalidíxico (10 µg/mL), kanamicina (10 µg/mL), novobiocina (10 µg/mL), penicilina G (20 µg/mL), rifampicina (10 µg/mL) e streptomina (16 µg/mL). Inicialmente foram preparadas soluções estoque de cada antibiótico na concentração de 100 mg/mL. As soluções foram esterilizadas por filtração em membrana 0,22 µm e o volume correspondente a concentração de uso de cada antibiótico foi adicionada no meio GYA.

Os experimentos de tolerância foram conduzidos em microplacas de 24 poços e uma alíquota de 10 µL da suspensão bacteriana em solução de NaCl 0,8% foi inoculada em cada poço. As microplacas foram incubadas a 28 °C (exceto as diferentes temperaturas testadas) por 14 dias e o resultado foi considerado positivo quando houve crescimento dos actinomicetos.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

A coleta realizada em São Sebastião em dezembro de 2008 resultou no isolamento de 226 bactérias, as quais foram preservadas na Divisão de Recursos Microbianos/CPQBA (DRM). O isolamento a partir de organismos marinhos resultou em 156 linhagens de bactérias e 70 isolados foram obtidos diretamente da água do mar. A Figura 1 mostra a distribuição do número de bactérias isoladas por meio de cultivo em cada fonte de isolamento. O meio M1 foi o mais eficiente para o isolamento de bactérias, resultando em 40,7%, seguidos dos meios TSA (32,3%); MA (19,5%) e ISP2 (4,4%) e AA (3,1%).

O maior número de bactérias foi isolado da água do mar, sendo 70 (31%) isolados no total, seguidas da esponja preta *Chelonaplysiela erecta*, sendo 39 (17,3%), da esponja amarela *Petronica citrina* com 35 (15,5%) e a alga verde *Codium intertextum* com 28 (12,4%)

bactérias isoladas. Por outro lado, o menor número de isolados, 1 bactéria, (0,4%) ocorreu na estrela do mar da família *Ophidiasteridae*. (Figura 1).

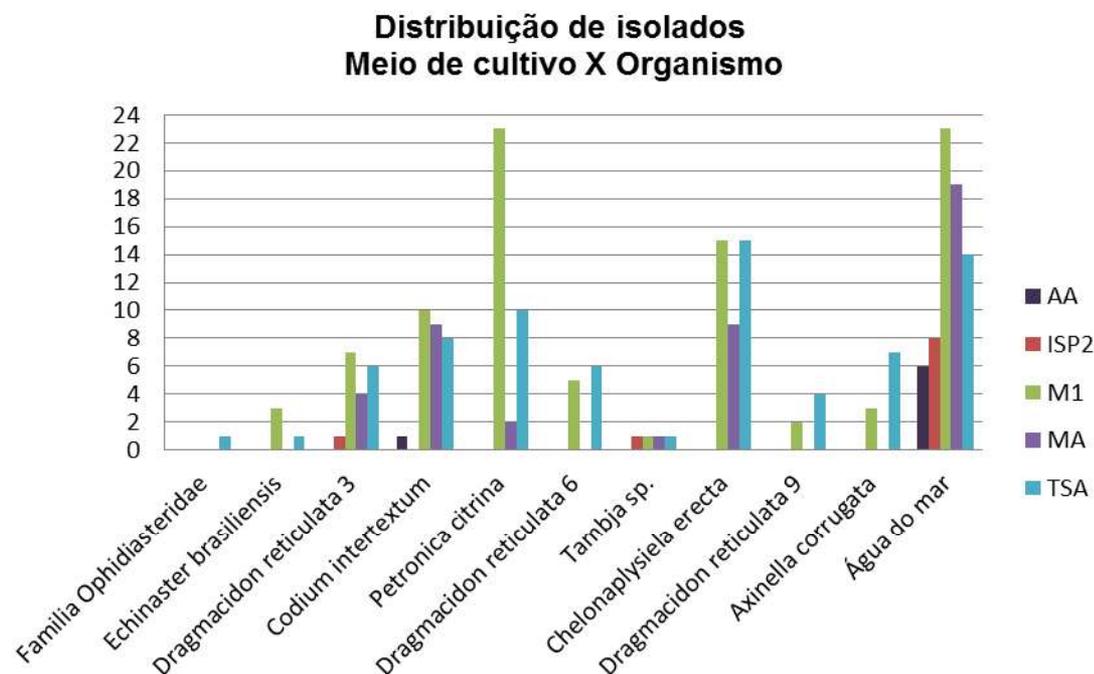


Figura 1. Distribuição do número de bactérias isoladas por meio de cultivo para cada fonte de isolamento (organismos marinhos e água do mar).

Menezes et al. (2010) obtiveram maior eficiência de isolamento com o meio M1 (45%), assim como o maior número de isolados a partir da ascídia *Didemnum ligulum* (17,7%), alga *Sargassum* (14,4%) e da esponja *Mycale angulosa* (11,6%), embora tenham sido bem distribuídos entre todos os macroorganismos (esponjas, ascídias e algas).

2.3.2. SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

Os 226 isolados bacterianos foram caracterizados, por análise macroscópica e microscópica e destes 130 foram Gram-positivos (Tabela S3, Apêndice IV). O DNA genômico destes isolados Gram-positivos foi obtido pelo protocolo descrito por Van Solingher (1993) e utilizado na seleção de actinobactérias com os *primers* grupo-específico.

Foram realizados os testes com os dois conjuntos de *primers* descritos como específicos para actinobactérias, para a triagem dos isolados. Stach et al. (2003) relataram a especificidade dos *primers* Act_F (SCAct235S20) e Act_R (SCAct878A19) avaliando 147 actinomicetos pertencentes a 27 diferentes gêneros, onde todos resultaram em amplicon de tamanho esperado exceto o gênero *Rubrobacter radiotolerans* e as 14 espécies Tipo de outros grupos taxonômicos avaliados. Nossos resultados mostram que os *primers* Act F e Act R não foram específicos para actinomicetos, amplificando todos os isolados utilizados na validação (Anexo 1, Figura 2) e não somente isolados do grupo actinobactérias como descrito por Stach et al. (2003).

De acordo com Roller, Ludwig e Schleifer (1992), os *primers*231nsV e 23InsR amplificam aproximadamente 375 pb do gene RNA ribossomal 23S de bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de G+C, o que indica a presença de uma inserção de aproximadamente 100 pb extras (podendo variar de 86 a 116 pb) na região variável do gene RNA ribossomal 23S. Essa inserção pode ser detectada por eletroforese em gel de agarose e facilmente ser distinguida de fragmentos homólogos que não a possuem. A inserção nos genes RNA ribossomal 23S foi detectada em 64 bactérias Gram-positivas com alto conteúdo G+C avaliadas enquanto não foi encontrada no gene de 55 bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G+C e em outras bactérias representantes de outros Filos. Assim, essa inserção de aproximadamente 100 pb dentro da parte central do gene RNA ribossomal 23S pode ser considerada um marcador filogenético para bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de G+C, como os actinobactérias (ROLLER; LUDWIG; SCHLEIFER, 1992). O teste inicial dos primers 231nsV e 23InsR foi realizado com 6 isolados de actinomicetos já caracterizados e três isolados de *Chromobacterium* como controle. De acordo com a Figura 2 os isolados de actinobactérias apresentaram um fragmento do gene RNA ribossomal 23S com a inserção de aproximadamente 100 pb comparado aos dos isolados de *Chromobacterium*.

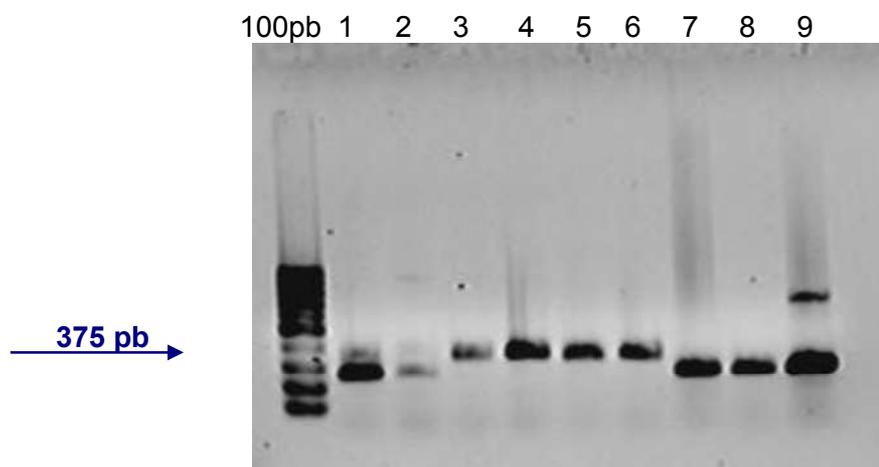


Figura 2. Amplificação de 375 pb da região do gene RNA ribossomal 23S com *primers* grupo-específicos (231nsV/23InsR). Amplificação a partir de 50 ng de DNA dos isolados: **1.** B204 (*Brevibacterium* sp.); **2.** B299 (*Brevibacterium* sp.) **3.** B255 (*Janibacter* sp.); **4.** B266 (*Micrococcus* sp.); **5.** B506 (*Saccharopolyspora* sp.); **6.** B305 (*Microbacterium* sp.); **7.** CBMAI 310 (*Chromobacterium* sp.); **8.** CBMAI 534^T (*Chromobacterium violaceum*); **9.** *Chromobacterium haemolyticum* CBMAI 1093^T.

Com a utilização dos *primers* descritos por Roller, Ludwig e Schleifer (1992), foram identificados 17 isolados candidatos a actinobactérias por apresentarem a inserção de 100 pb no gene RNA ribossomal 23S (Figura 2). Desses isolados, somente 13 foram identificados como pertencentes Filo Actinobacteria e pertencem aos gêneros *Curtobacterium* (1 isolado), *Mycobacterium* (1 isolado), *Micrococcus* (4 isolados), *Serinicoccus* (1 isolado), *Saccharopolyspora* (1 isolado), *Janibacter* (1 isolado) e *Streptomyces* (4 isolados).

Os meios foram escolhidos para favorecerem o isolamento de actinomicetos, portanto, apenas 13 isolados de actinomicetos foram recuperados, sendo apenas quatro pertencentes ao gênero *Streptomyces*, gênero este que tem sido reportado o mais abundante grupo recuperado de ambientes marinhos (ZHANG et al., 2008).

De acordo com Menezes et al. (2010), a análise de diversidade realizada com os isolados da primeira coleta, 30,4% dos isolados foram classificados como pertencentes ao Filo Actinobacteria, e identificados 59 isolados de actinomicetos, por análise de sequência do gene RNA ribossomal, como pertencentes a 17 gêneros distintos, incluindo *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Gordonia*, *Janibacter*,

Kineococcus, *Knoellia*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Sacharopolyspora* e *Williamsia*, já encontrados em ambientes marinhos (BREDHOLDT et al., 2007; FIEDLER et al., 2005; KAGEYAMA et al., 2007; LEE, 2006^a, 2006b; MALDONADO et al., 2005; ZHANG et al., 2006) com exceção do gênero *Curtobacterium* que havia sido reportado em ambiente marinho apenas por métodos independentes de cultivo (GONTANG et al., 2007). Assim, foram definidas as 72 linhagens de actinobactérias utilizadas para os estudos taxonômicos e avaliação das atividades antiviral e antimicrobiana.

As análises filogenéticas das sequências do gene RNA ribossomal 16S foram feitas por gêneros e indicaram que isolados pertencentes aos gêneros *Marmoricola* (Figura 3, A), *Gordonia* (Figura 3, B), *Williamsia* (Figura 4, A), *Janibacter* (Figura 4, B), *Kineococcus* (Figura 5, A), *Knoellia* (Figura 5, B) e *Serinicoccus* (Figura 5, C), são potenciais novas espécies e, possivelmente, potenciais produtores de novos metabólitos bioativos. A Tabela 2 mostra as similaridades dos isolados de actinomicetos com as linhagens Tipo encontradas do banco de dados do servidor EzTaxon-e (www.ezbiocloud.net/eztaxon/results, 9 de abril, 2015). Assim, o foco do trabalho passou a ser a identificação em nível de espécie desses isolados, que foi conduzida por análise polifásica, envolvendo análise de genes conservados (*Multilocus Sequence Analysis* – MLSA), hibridação DNA-DNA, análise de FAME, conteúdo de CG%, entre outras técnicas utilizadas na taxonomia bacteriana.

Tabela 2. Comparação das sequências do gene RNA ribossomal 16S dos isolados de actinomicetos com as linhagens Tipo do banco de dados Eztaxon-e.

Amostras	Rank	Linhagem tipo		Genbank	Similar//e (%)	Nts Diferentes /total
<i>Janibacter</i> B742	1	<i>J. indicus</i>	0704P10-1 ^T	HM222655	99.51	7/1430
	2	<i>J. terrae</i>	CS12 ^T	AF176948	98.66	19/1416
	3	<i>J. hoylei</i>	DSM 21601 ^T	FR749912	98.39	23/1430
	4	<i>J. cremeus</i>	HR08-44 ^T	AB778259	98.38	23/1416
	5	<i>J. limosus</i>	DSM 11140 ^T	Y08539	98.31	24/1416
	6	<i>J. anophelis</i>	CCUG 49715 ^T	AY837752	98.18	26/1428
	7	<i>J. melonis</i>	CM2104 ^T	AY522568	97.74	32/1415
	8	<i>J. corallicola</i>	04PA2-Co5-61 ^T	AB286023	97.41	37/1426
	9	<i>J. alkaliphilus</i>	SCSIO 10480 ^T	JN160681	97.33	37/1385
<i>Kineococcus</i> B366	1	<i>K. endophytica</i>	KLBMP 1274 ^T	JQ819257	98.88	16/1433
	2	<i>K. aurantiacus</i>	IFO 15268 ^T	X77958	98.63	19/1390
	3	<i>K. rhizosphaerae</i>	RP-B16 ^T	FM210338	98.50	21/1402
	4	<i>K. radiotolerans</i>	SRS30216 ^T	CP000750	98.13	27/1443
	5	<i>K. gynurae</i>	KKD096 ^T	EF667339	97.07	39/1329
	6	<i>K. glutinatus</i>	YIM 75677 ^T	JQ314347	94.94	73/1443
	7	<i>K. xinjiangensis</i>	S2-20 ^T	EU543662	94.29	79/1383
<i>Knoellia</i> B175	1	<i>K. flava</i>	TL1 ^T	HQ401007	99.51	7/1431
	2	<i>K. sinensis</i>	DSM 12331 ^T	AJ294412	98.46	22/1424
	3	<i>K. subterranea</i>	DSM 12332 ^T	AJ294413	98.17	26/1421
	4	<i>K. locipacati</i>	DMZ1 ^T	HQ171909	97.74	32/1417
<i>Marmoricola</i> B374	1	<i>M. aequoreus</i>	SST-45 ^T	AM295338	98.49	21/1393
	2	<i>M. korecus</i>	Sco-A36 ^T	FN386723	97.82	31/1419
	3	<i>M. scoriae</i>	Sco-D01 ^T	FN386750	97.61	34/1420
	4	<i>M. aurantiacus</i>	BC361 ^T	Y18629	97.27	39/1426
	5	<i>M. bigeumensis</i>	MSL-05 ^T	EF466120	96.29	53/1428

Tabela 2. Continuação.

Williamsia B138	1	<i>W. serinedens</i>	IMMIB SR-4 ^T	AM283464	98.96	15/1441
	2	<i>W. deligens</i>	IMMIB RIV-956 ^T	AJ920290	98.96	15/1439
	3	<i>W. maris</i>	SJS0289-JS1 ^T	AB010909	97.53	36/1455
	7	<i>W. phyllosphaerae</i>	C7 ^T	FR691321	96.85	43/1365
	21	<i>W. stercuriae</i>	CPCC 203464 ^T	KC550143	96.08	57/1455
Williamsia B375	1	<i>W. serinedens</i>	IMMIB SR-4 ^T	AM283464	99.44	8/1426
	2	<i>W. deligens</i>	IMMIB RIV-956 ^T	AJ920290	97.83	31/1427
	3	<i>W. maris</i>	SJS0289-JS1 ^T	AB010909	96.50	50/1427
	4	<i>W. phyllosphaerae</i>	C7 ^T	FR691321	96.48	48/1364
Williamsia B452	1	<i>W. serinedens</i>	IMMIB SR-4 ^T	AM283464	99.46	7/1293
	2	<i>W. deligens</i>	IMMIB RIV-956 ^T	AJ920290	97.83	28/1292
	3	<i>W. maris</i>	SJS0289-JS1 ^T	AB010909	96.59	45/1321
	4	<i>W. phyllosphaerae</i>	C7 ^T	FR691321	96.45	45/1267
Serinicoccus B736	1	<i>S. profundi</i>	MCCC 1 ^a 05965 ^T	EU603762	98.01	28/1407
	2	<i>S. marinus</i>	JC1078 ^T	AY382898	97.84	29/1341
	3	<i>S. chungangensis</i>	CAU 9536 ^T	HM068886	97.65	33/1404
Gordonia B204	1	<i>G. terrae</i>	NBRC 100016 ^T	BAFD01000032	99.86	2/1386
	2	<i>G. lacunae</i>	BS2 ^T	EF151959	99.28	10/1384
	3	<i>G. rubripertincta</i>	NBRC 101908 ^T	BAHB01000127	98.20	25/1386
	4	<i>G. namibiensis</i>	NBRC 108229 ^T	BAHE01000050	98.05	27/1386
	5	<i>G. bronchialis</i>	DSM 43247 ^T	CP001802	97.98	28/1386
	6	<i>G. rhizosphaera</i>	NBRC 16068 ^T	BAHC01000019	97.91	29/1386
	7	<i>G. desulfuricans</i>	NCIMB 40816 ^T	AF101416	97.91	29/1386
	8	<i>G. amicalis</i>	NBRC 100051 ^T	BANS01000072	97.83	30/1384
	9	<i>G. humi</i>	CC-12301 ^T	FN561544	97.82	30/1375
	10	<i>G. alkanivorans</i>	NBRC 16433 ^T	BACI01000096	97.76	31/1386

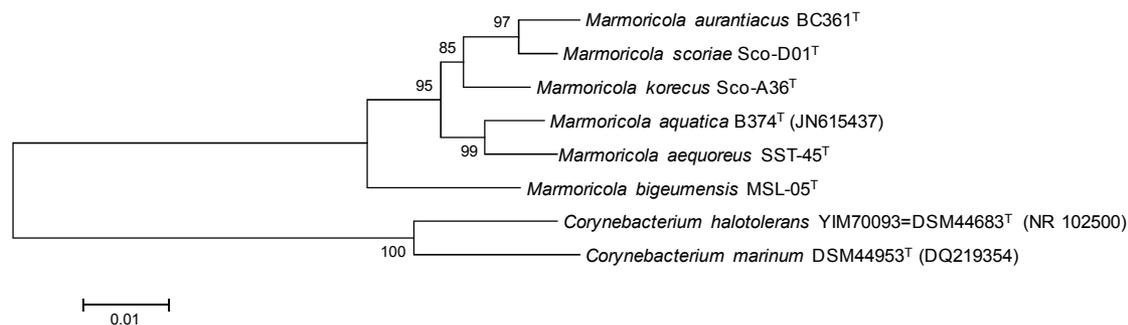
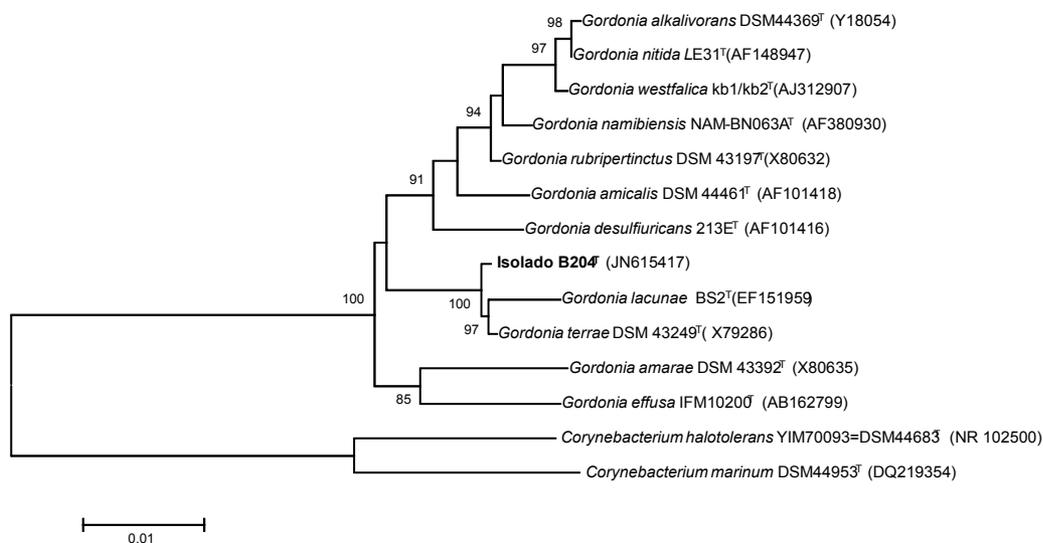
A**B**

Figura 3. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Marmoricola* (A) e *Gordonia* (B) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

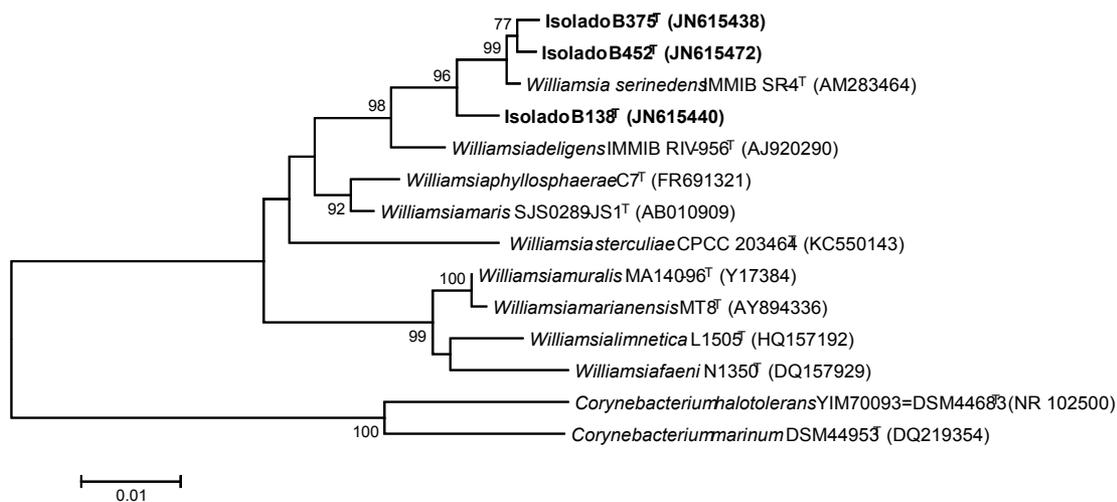
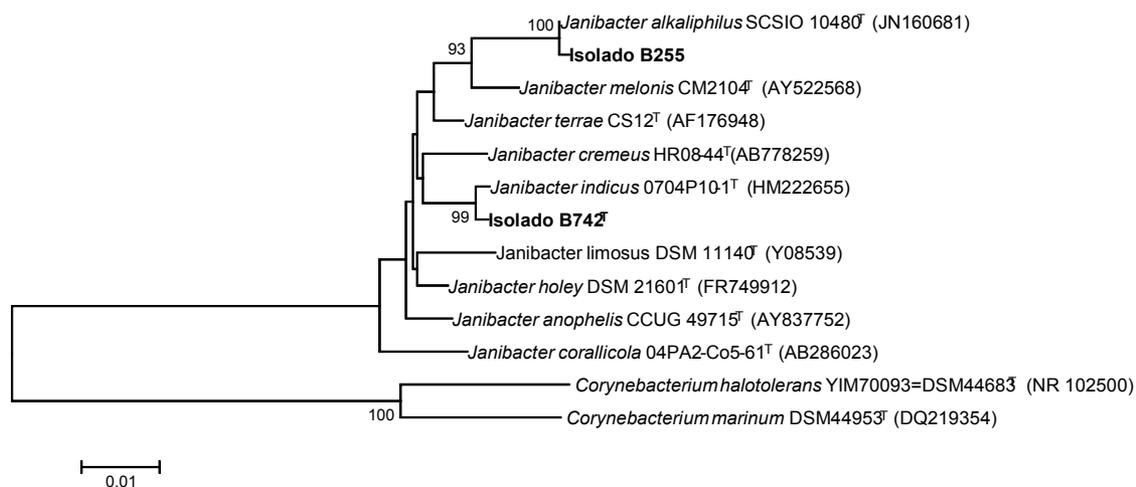
A**B**

Figura 4. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Williamsia* (A) e *Janibacter* (B) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

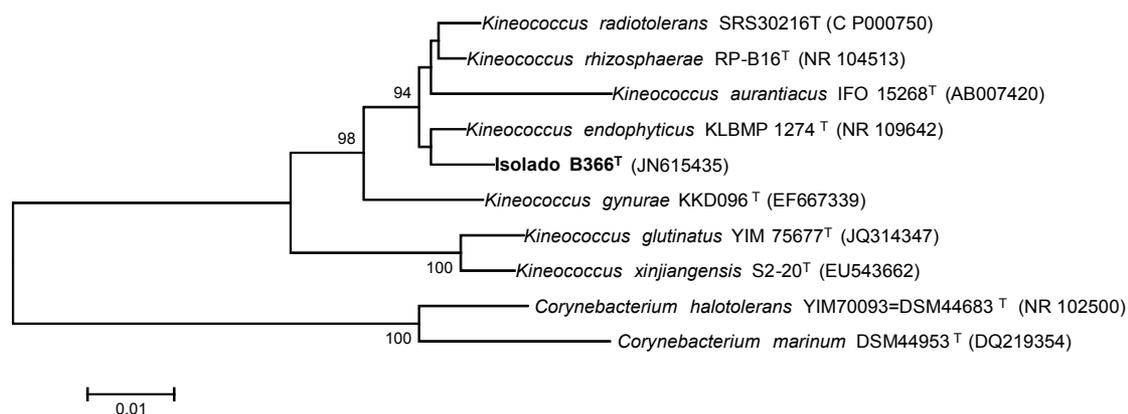
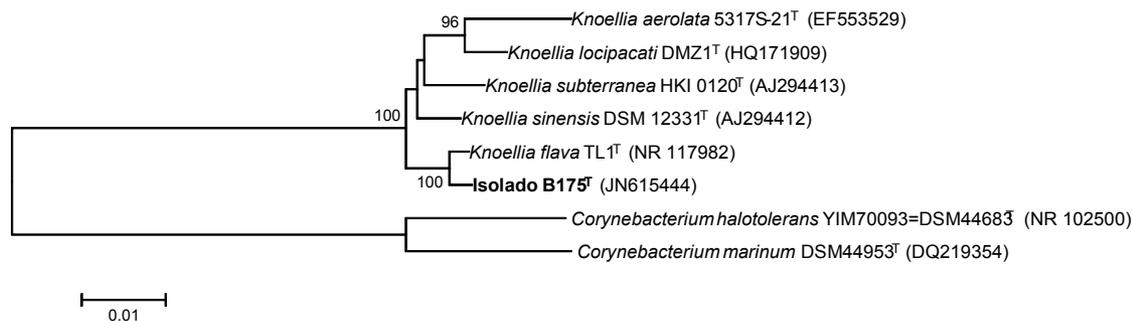
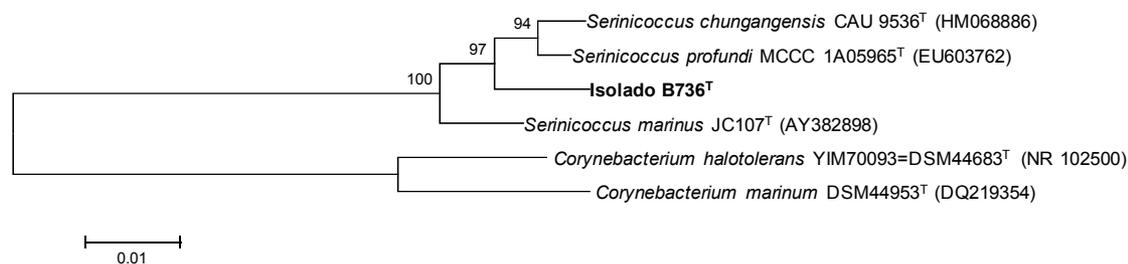
A**B****C**

Figura 5. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes aos gêneros *Kineococcus* (A), *Knoellia* (B) e *Serinicoccus* (C) com base em sequências dos genes RNA ribossomal 16S. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

2.4. MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)

Os isolados pertencentes aos gêneros *Marmoricola* (B374), *Gordonia* (B204), *Williamsia* (B138, B375 e B452), *Knoellia* (B175), *Janibacter* (B742), *Kineococcus* (B366), e *Serinicoccus* (B736), foram caracterizados por MLSA, para confirmar relação filogenética obtida pelo sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S e confirmar a hipótese de possíveis novas espécies.

As sequências parciais do gene RNA ribossomal dos isolados de actinobactérias apresentaram similaridades entre 96 e 99,5% com sequências de linhagens dos respectivos gêneros (Tabela 2). A análise filogenética das sequências do gene RNA ribossomal 16S do gênero *Williamsia*, revelou que os isolados B138, B375 e B452 formam um grupamento coeso com alto valor de *bootstrap* (98 %) com as linhagens tipo *W. serinedens* e *W. deligens* (Figura 4, A). Ainda, o isolado B138 forma um ramo separado das outras linhagens e os isolados B375 e B452 formam um grupo com baixo valor de *bootstrap* (77 %) (Figura 4, A).

Em relação ao gênero *Gordonia*, o isolado B204 formou um grupamento coeso com as linhagens tipo *G. terrae* e *G. lacunae*, com alto valor de *bootstrap* (99 %), mesmo formando um ramo separado dessas linhagens tipo (Figura 3, B). O mesmo ocorreu para isolado B742, que formou um grupo com a linhagem *Janibacter indicus* (99 %) (Figura 4, B). Enquanto o isolado B736 (*Serinicoccus*) formou um ramo isolado dentre as linhagens tipo do gênero, com alto valor de *bootstrap* (97 %) (Figura 5, C).

A análise filogenética do gênero *Kineococcus* revelou que o isolado B366 forma um grupo com a linhagem *K. endophiticus*, com baixo valor de *bootstrap* (62 %) (Figura 5, A). Ao contrário para o isolado B175, que formou um grupo com a linhagem *Knoellia flava* com alto valor de *bootstrap* (100 %) (Figura 5, B) e para o isolado B374 que formou um grupo com a linhagem *Marmoricola aequoreus* com valor de 99 % de *bootstrap* (Figura 3, A).

A análise filogenética das sequências do gene RNA ribossomal 16S sugere que os isolados B138, B175, B204, B366, B374, B375, B452, B742, e B736 são espécies novas dentro dos respectivos gêneros. As sequências dos genes conservados *rpoA*, *rpoB*, *recA*, *trpB* e *gyrB* dos isolados de actinobactérias obtidas por PCR e sequenciamento corresponderam aos tamanhos de fragmentos esperados. As árvores filogenéticas foram construídas com sequências parciais de cada gene (Apêndices V a XI) e com os genes concatenados (Figuras 6 a 12).

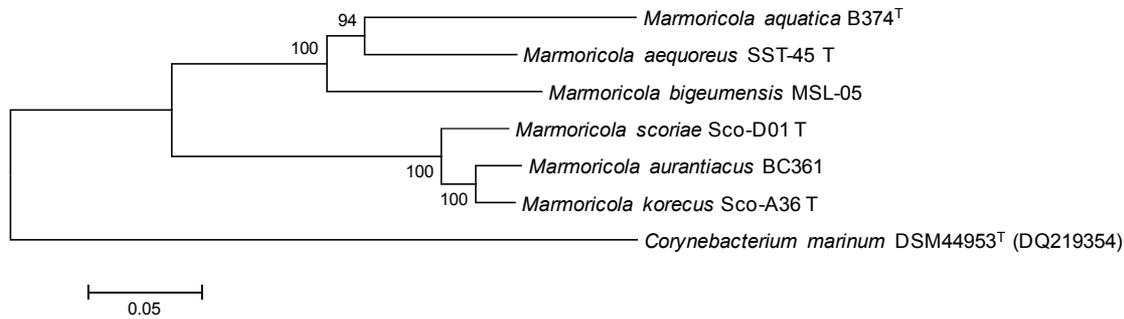
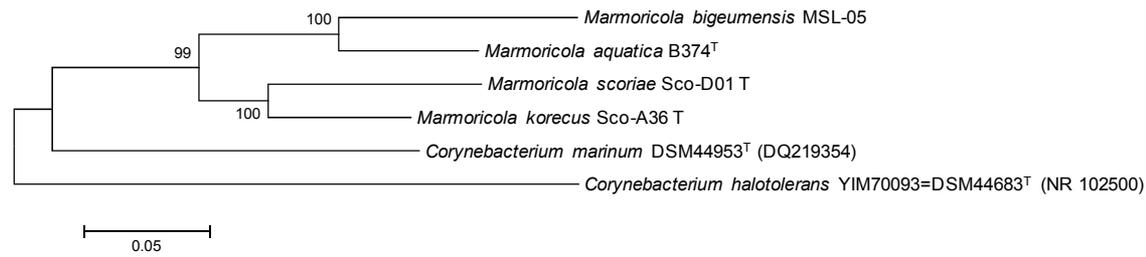
A**B**

Figura 6. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Marmoricola* com base em sequências dos genes concatenados: **A.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB*); **B.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoB_rpoA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

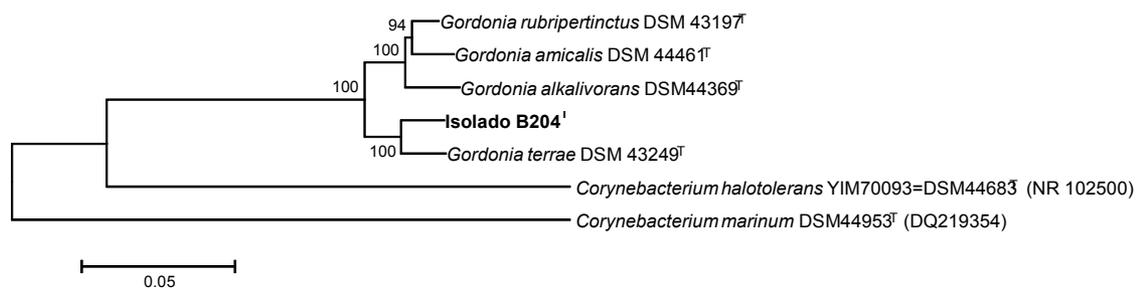


Figura 7. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Gordonia* com base em sequências dos genes concatenados: *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoB_rpoA_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

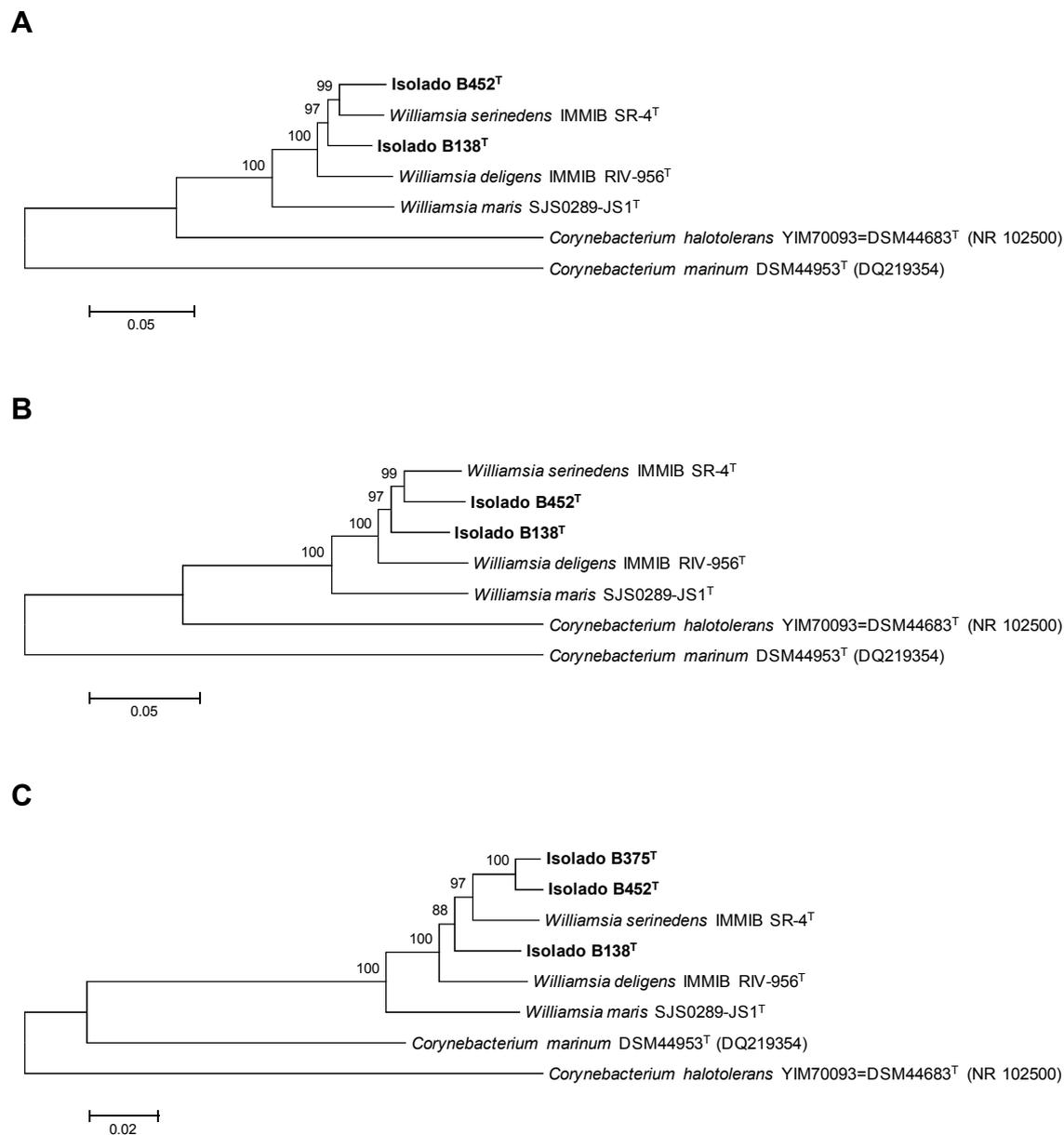


Figura 8. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Williamsia* com base em sequências dos genes concatenados: **A.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoB_rpoA_gyrB*); **B.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoB_rpoA_gyrB_trpB*); **C.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoA_trpB*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

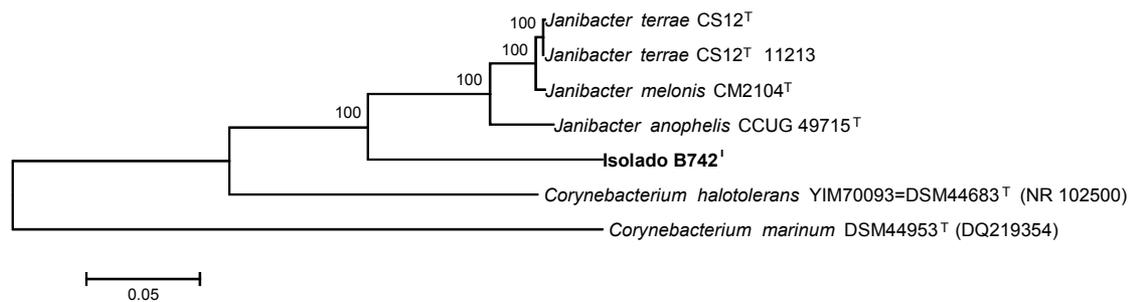
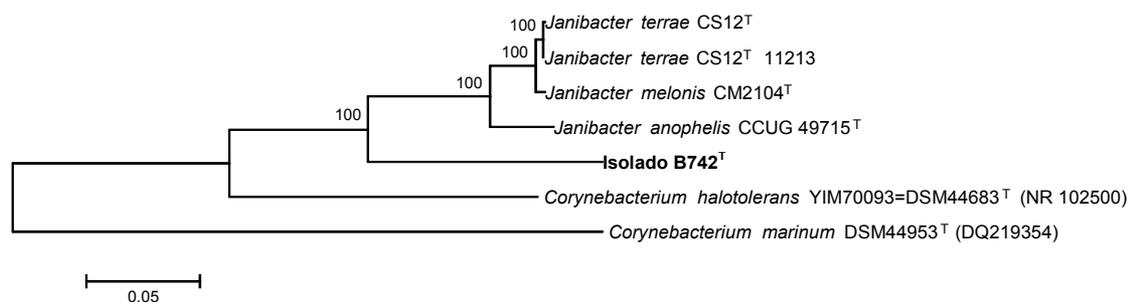
A**B**

Figura 9. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Janibacter* com base em sequências dos genes concatenados: **A.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB*); **B.** *MLSA*: Genes concatenados (16S_*rpoB_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

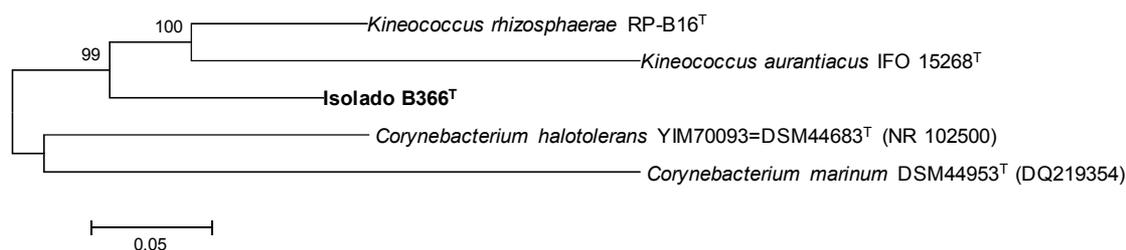


Figura 10. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Kineococcus* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoB_gyrB_recA*). Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

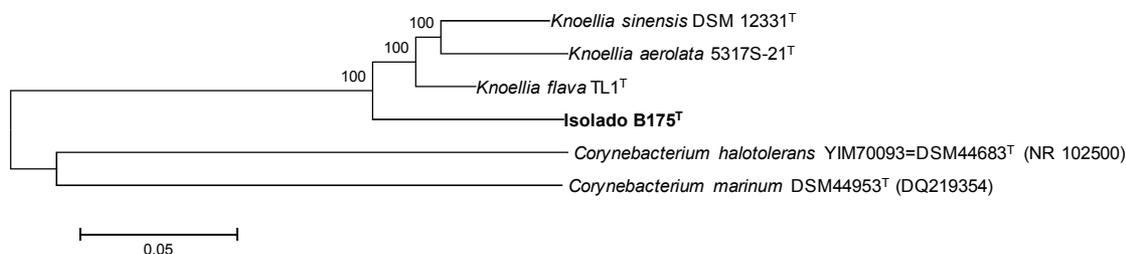


Figura 11. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Knoellia* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoA_gyrB_recA_trpB*). Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

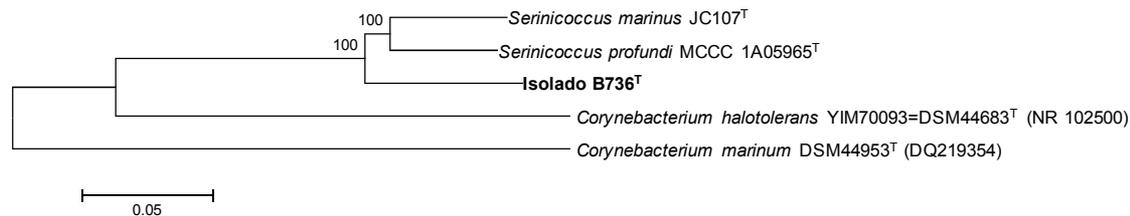


Figura 12. Análises filogenéticas de isolados de actinobactéria pertencentes ao gênero *Serinicoccus* com base em sequências dos genes concatenados. *MLSA*: Genes concatenados (16S_ *rpoB_rpoA_gyrB_recA_trpB*). Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1.000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

As árvores filogenéticas dos genes concatenados e isolados confirmaram os resultados encontrados nas análises de sequências do gene RNA ribossomal 16S, apresentando praticamente a mesma estrutura, para todos os gêneros avaliados. Assim como, para os genes isolados, as árvores filogenéticas apresentaram a mesma topologia do gene RNA ribossomal 16S (Apêndices V a XI). Os genes analisados neste estudo mostraram-se eficientes marcadores para os gêneros avaliados, apresentando topologias similares, exceto gene *recA* para o gênero *Marmoricola* e *Williamsia* (Apêndice V, D; Apêndice VII, E). O gene *rpoA* para o gênero *Knoellia*, *gyrB* para o gênero *Janibacter* e *rpoB* para o gênero *Kineococcus*, não reproduziram totalmente a topologia da árvore filogenética do gene RNA ribossomal 16S, enquanto todos os outros genes foram bem coerentes com a análise do gene RNA ribossomal 16S e dos genes concatenados. Enfim, as árvores filogenéticas obtidas a partir das sequências dos genes concatenados e dos genes isolados, mostraram claramente a distinção dos isolados estudados das espécies tipo já descritas confirmando o resultado encontrado na análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S e reforçando a hipótese de outras novas espécies.

Segundo Young et al. (2008) a análise de MLSA resultando em árvore filogenética de genes concatenados deve excluir as sequências do gene RNA ribossomal 16S, pois devido a degeneração dos códons os genes *housekeeping*, estes estão sujeitos a um menor nível de seleção, restrita aos segundos e terceiros códons, enquanto que o gene RNA ribossomal 16S todas as bases são igualmente conservadas e codificam o produto RNA ribossomal. Esta diferença pode contribuir para um desbalanceamento quando os genes estão concatenados e pode explicar a falta de congruência reportada por Martens et al. (2008).

A análise de MLSA dos isolados sem as sequências do gene RNA ribossomal 16S mostrou uma árvore filogenética com estrutura similar a árvore filogenética que inclui as sequências do gene RNA ribossomal 16S indicando que este gene não alterou a análise. A análise concatenada de dois, três, quatro e cinco genes, é importante para avaliação dos melhores marcadores, como mostrado em estudos anteriores para diferentes gêneros de bactérias (CURTIS; MEYERS, 2012; MENEZES, 2009). Guo et al. (2008) analisaram 55 linhagens de *Streptomyces* com seis genes concatenados, incluindo o gene RNA ribossomal 16S e obtiveram excelentes resultados para elucidar a relação interespecífica no gênero *Streptomyces*.

A análise por MLSA compara as sequências por similaridade e as análises filogenéticas são feitas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência (CHRISTENSEN et al., 2007). Esta análise tem sido proposta como substituta da técnica de hibridação DNA-DNA na descrição de espécies. Shen (2006) avaliou as sequências do gene *gyrB* para o gênero *Gordonia* e relatou que a classificação baseada nos dados de sequência do gene *gyrB* correlacionou bem com os dados baseados na hibridação DNA-DNA. O sucesso desta análise depende da escolha dos genes conservados, da disponibilidade de sequências dos genes em bancos de dados e/ou das linhagens tipo (CARRO et al., 2012; MENEZES, 2009; RONG; GOU; HUANG, 2009; RONG; HUANG, 2010), Neste estudo não foi possível incluir, nas análises de MLSA, as linhagens tipo *Knoellia flava* e *Janibacter indicus*, o que seria importante para sustentar a proposta de utilização desta técnica na descrição de novas espécies e propô-la em substituição à técnica de hibridação DNA-DNA, conforme sugerido por Zeigler (2003).

2.5. CONTEUDO DE GC E HIBRIDAÇÃO DNA-DNA

O conteúdo de GC foi determinado a partir da temperatura de *melting*TM, e a partir deste, foi determinada a temperatura ótima de renaturação (Tor) conforme descrito por De Ley et al. (1970). A temperatura ótima de renaturação foi utilizada nos experimentos de hibridação (GONZALEZ; SAIZ-JAMENEZ, 2005), onde foi determinado a diferença de temperatura de *melting* entre os DNAs teste das possíveis novas espécies investigadas neste estudo e das linhagens tipo mais próximas.

A Tabela 3 mostra os resultados da Tm obtidos pelo método fluorimétrico dos nove isolados de actinomicetos, e os resultados de %GC e Tor (°C) a partir dos cálculos das equações 1 e 2, respectivamente. O conteúdo de GC das linhagens Tipo foram obtidos das respectivas literaturas e os valores de %GC obtidos encontra-se congruentes com os valores encontrados para as linhagens pertencentes aos respectivos gêneros.

Tabela 3. Tm, conteúdo de %GC e Tor de renaturação dos isolados de actinomicetos.

Gênero	Linhagens	Tm (°C)	%GC (Equação 1)	Tor (°C) (Equação 2)	%GC gênero
<i>Williamsia</i>	B138	72,53	73,25	84,36	64-68
<i>Williamsia</i>	B375	71,54	71,28	83,36	64-68
<i>Williamsia</i>	B452	72,43	73,06	84,26	64-68
<i>Knoellia</i>	B175	72,73	73,65	84,56	68-74
<i>Kineococcus</i>	B366	73,48	75,15	85,32	72-75
<i>Marmoricola</i>	B374	73,03	74,25	84,87	70-74
<i>Serinicoccus</i>	B736	70,34	68,90	82,14	70-73
<i>Gordonia</i>	B204	71,17	70,53	83,00	63-69
<i>Janibacter</i>	RI06	71,39	70,99	83,20	68-73

A hibridação DNA-DNA foi realizada para confirmar os resultados obtidos com as análises do gene RNA ribossomal 16S e de MLSA dos isolados de actinomicetos visando a confirmação da suposição de novas espécies dos gêneros *Williamsia* (B138, B375 e B452), *Knoellia* (B175), *Janibacter* (B742), *Kineococcus* (B366), *Marmoricola* (B374) e *Gordonia* (B204). A hibridação DNA-DNA ainda é considerada técnica padrão para a delimitação das

espécies procarióticas embora dependa da linhagem tipo para ser realizada (KUMAR; GOODFELLOW, 2008; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; VANDAMME et al., 1996).

Comparando as sequências do gene ribossomal 16S com banco de dados do servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012), obtivemos como resposta, as linhagens tipo mais próximas, com a porcentagem de similaridade e a quantidade de nucleotídeos diferentes comparadas ao total de nucleotídeos das sequências. Meier-Kolthoff et al. (2013) afirmaram que as análises de hibridação DNA-DNA, entre o isolado possível nova espécie e as linhagens filogeneticamente mais próximas, não são necessárias quando os valores de similaridade entre as sequências do gene RNA ribossomal 16S forem menores que 99%, valor de corte recomendado para estudos obrigatórios de hibridação DNA-DNA para membros de Actinobacteria.

De acordo com a Tabela 2, os estudos de hibridação são necessários para os isolados B742 (*Janibacter*) com *Janibacter indicus* 0704P10-1^T, B175 com *Knoellia flava* TL1^T, B375 e B452 (*Williamsia*) com *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T e B204 (*Gordonia*) com *Gordonia terrae* NBRC 100016^T, para os demais isolados, B374, B366, B138 e B736, não é necessário a hibridação DNA-DNA.

Em relação à hibridação DNA-DNA, temos confirmadas, como novas espécies, os isolados B175, B204, B375 e B736. Na técnica de hibridação DNA-DNA os valores iguais ou superiores a 70% e $\Delta T_m \leq 5$ °C de homologia indicam que o organismo pertence àquela espécie (WAYNE, et al., 1987; COHAN, PERRY, 2007), em contrapartida, valores inferiores indicam novas espécies. Assim, os resultados de hibridação das linhagens B175, B204, B375 e B736 com as linhagens tipo mais próximas foram apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Hibridação DNA-DNA para os isolados B204, B375, B175 e B736, pelo método fluorimétrico.

Gênero	Isolados	Linhagens	Tm (°C)	ΔTm	% Hibridação DNA-DNA
<i>Gordonia</i>	B204	B204	69,17	-	-
		<i>G. lacunae</i>	62,10	7,07	54,7
		<i>G. terrae</i>	63,77	5,40	63,0
<i>Williamsia</i>	B375	B375	73,4	-	-
		B138	65,2	8,2	49,0
		B452	65,1	8,3	48,5
		<i>W. maris</i>	68,0	5,4	63,2
		<i>W. serinedens</i>	64,7	8,7	46,5
<i>Knoellia</i>	B175	B175	76,43	-	-
		<i>K. flava</i>	71,10	5,33	63,3
<i>Serinicoccus</i>	B736	B736	72,2	-	-
		<i>S. profundus</i>	63,1	9,1	44,5
		<i>S. marinus</i>	61,7	10,5	37,5

O isolado B375 apresentou 63,2% de hibridação DNA-DNA com a linhagem *W. maris* e 46,5% com *W. serinedens*. Ainda, os resultados de hibridação indicam que a isolado B375 não pertence às espécies dos isolados B138 e B452.

O isolado B736 apresentou valores inferiores de hibridação DNA-DNA com as linhagens tipo *Serinicoccus profundus* (44,5%) e *S. marinus* (37,5%) e $\Delta Tm > 5$ °C com valores de 9,1 para *S. profundus* e 10,5 para *S. marinus*, confirmando a nova espécie e corroborando com os resultados obtidos pela análise de MLSA. Assim como para os isolados B175, com valor de hibridação DNA-DNA de 63,3% com *Knoellia flava* ($\Delta Tm = 5,33$), e o isolado B204 que apresentou valores de 63,3% com *Gordonia terrae* e 54,7% com *Gordonia lacunae*, e ambos, com $\Delta Tm > 5$ °C (7,07 e 5,40, respectivamente).

O isolado *Kineococcus* B366, não pertence às espécies *K. aurantiacus* CBMAI 1406 (65,44%) e *K. rhizosphaerae* CBMAI 1424 (66,15%), pois os valores de hibridação obtidos pela metodologia descrita por Destéfano et al. (2003) e Gonçalves e Rosato (2000), foram inferiores a 70%. Porém, examinando a sequência do gene ribossomal 16S, usando o servidor EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>; (CHUN et al., 2007), para determinar a validade

das espécies mais próximas, o isolado B366 apresentou porcentagem de similaridade de sequência de 98,88 % com a linhagem tipo descrita recentemente, *Kineococcus endophytica* (BIAN et al., 2012), e 98,63% e 98,50% com *K. aurantiacus* e *K. rhizosphaerae*, respectivamente. Considerando-se obrigatória a hibridação DNA-DNA, para a descrição da espécie, quando a similaridade entre bactérias é acima de 99%, não há a necessidade da hibridação DNA-DNA do isolado B366 com a linhagem *K. endophytica*. Em adição a estes resultados, a Figura 5, A. mostra a análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S do isolado B366 formando um grupamento com a linhagem tipo *K. endophytica*, porém com *bootstrap* baixo, reforçando a hipótese de nova espécie.

Em relação ao isolado B175, o qual apresentou similaridade da sequência do gene RNA ribossomal 16S de 99,51 % (> 99%) com a linhagem tipo *Knoellia flava* (YU et al., 2012). A análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S, mostrou que mesmo o isolado B175 sendo mais próximo da linhagem de *K. flava* pode pertencer a uma nova espécie (Figura 5, B).

Por outro lado, o isolado B374, apresentou similaridade da sequência do gene RNA ribossomal 16S de 98,49 % com a linhagem tipo mais próxima, *M. aequoreous*, não sendo necessária a hibridação DNA-DNA, para descrição da espécie. Foi descrita a espécie *Marmoricola aquaticus* cujo artigo de descrição de espécie nova consta no Apêndice I.

A hibridação DNA-DNA do isolado B742 não foi realizada com a linhagem Tipo *Janibacter indicus* 0704P10-1^T, descrita recentemente (ZHANG et al., 2014), a qual não temos ainda em nossa coleção. Este experimento se faz necessário uma vez que o isolado B742 apresentou 99,5 % de similaridade com a sequência do gene RNA ribossomal 16S da linhagem Tipo.

2.6. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ACTINOMICETOS

As características de crescimento, coloração micelial e reversa, pigmentos difundíveis foram avaliadas em diferentes meios de cultivo e os resultados encontram-se descritos na Tabela 5. Ainda, todos os isolados foram capazes de crescer nos meios NA e TSA. Os testes de degradação, bioquímicos, atividade enzimática, de tolerância, FAME e menaquinomas e lipídeos polares foram realizados para os isolados considerados novas espécies (Tabela 6).

Todos os isolados são aeróbicos, Gram positivos, oxidase negativos e catalase positivos. As propriedades morfológicas e bioquímicas dos isolados foram consistentes com as respectivas classificações dentro dos gêneros.

Tabela 5. Crescimento e características fenotípicas dos isolados possíveis novas espécies de actinomicetos após incubação a 28 °C por 14 dias.

Linagens: **1.** *Marmoricola aquática* B374¹; **2.** *Gordonia* B204; **3.** *Williamsia* B138; **4.** *Williamsia* B375; **5.** *Williamsia* B452; **6.** *Janibacter* B742; **7.** *Kineococcus* B366; **8.** *Knoellia* B175; **9.** *Serinicoccus* B736.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ISP1									
Crescimento	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	nd
Coloração micelial	Laranja escuro com borda mais clara	Salmão	Laranja	Laranja	Salmão	Crème	Amarelo alaranjado	Creme	nd
Coloração substrato /reversa	Laranja escuro com borda mais clara	Salmão	Laranja	Laranja	Salmão	Creme amarelado	Amarelo alaranjado	Creme	nd
Pigmento difusível	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ISP2**									
Crescimento	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++
Coloração micelial	Laranja escuro com borda mais clara	Salmão escuro	Laranja	Laranja escuro	Salmão brilhante		Laranja	Creme	Creme amarelado
Coloração substrato	Laranja escuro com borda mais clara	Salmão escuro	Laranja	Laranja escuro	Salmão		Laranja	Creme	Creme amarelado

** Não houve produção de pigmento difusível para nenhum dos isolados. Crescimento: + baixo; ++ moderado; +++ alto

Tabela 5. Continuação.

Linhas: **1.** *Marmoricola aquática* B374^T; **2.** *Gordonia* B204; **3.** *Williamsia* B138; **4.** *Williamsia* B375; **5.** *Williamsia* B452; **6.** *Janibacter* B742; **7.** *Kineococcus* B366; **8.** *Knoellia* B175; **9.** *Serinicoccus* B736.

Meios	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ISP3**									
Crescimento	++	+	+	++	+		+	+	++
Coloração micelial	Amarelo brilhante	Salmão	Laranja claro	Laranja claro	Laranja claro		Amarelo	Creme transparente	Creme claro
Coloração substrato	Amarelo	Laranja claro	Laranja claro	Laranja claro	Laranja claro		Amarelo	Creme transparente	Creme claro
ISP4**									
Crescimento	+	+	+	+	++		+	+	+
Coloração micelial	Amarelo transparente	Salmão claro	Laranja claro	Amarelo claro	Laranja claro		Laranja claro	Creme claro	Creme claro
Coloração substrato	Amarelo claro	Salmão claro	Laranja claro	Amarelo claro	Laranja claro		Laranja claro	Creme claro	Creme claro
ISP5**									
Crescimento	+	++	+	++	+++		+	+	+
Coloração micelial	Laranja claro	Salmão	Laranja transparente	Laranja escuro	Laranja		Laranja claro	Creme claro	Creme transparente
Coloração substrato	Amarelo claro	Salmão	Transparente	Laranja escuro	Laranja		Laranja claro	Creme claro	Creme transparente

** Não houve produção de pigmento difusível para nenhum dos isolados. Crescimento: + baixo; ++ moderado; +++ alto

Tabela 5. Continuação.

Linhas: **1.** *Marmoricola aquatica* B374^T; **2.** *Gordonia* B204; **3.** *Williamsia* B138; **4.** *Williamsia* B375; **5.** *Williamsia* B452; **6.** *Janibacter* B742; **7.** *Kineococcus* B366; **8.** *Knoellia* B175; **9.** *Serinicoccus* B736.

Meios	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ISP7									
Crescimento	+	++	+	++	+++		+	++	+
Coloração micelial	Laranja claro	Salmão	Laranja transparente	Laranja escuro	Laranja		Laranja claro	Creme	Creme transparente
Coloração substrato	Amarelo claro	Salmão	Transparente	Laranja escuro	Laranja		Laranja claro	Creme	Creme transparente
Pigmento difusível	+	-	-	-	-		-	+	-

** Não houve produção de pigmento difusível para nenhum dos isolados.

Crescimento: + baixo; ++ moderado; +++ alto

Tabela 6. Características fenotípicas e quimiotaxonômicas dos isolados de actinomicetos.

Linhagens: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Coloração colônia	laranja	amarela	laranja	laranja	Laranja	laranja	laranja	laranja	creme	amarela
Temperatura ^o C)	10-37	10-37	10-37	10-37	10-37	22-30	10-37	10-37	10-37	4-37
pH	6 – 10	5 – 2	4 – 10	4 – 10	4 – 10	4 – 10	4 – 10	4 – 10	5 - 10	5 - 9
Concentração de NaCl(%)	0 - 3	0 – 7	0 – 7	0 – 7	0 – 7	0 – 7	0 – 7	0 – 7	0 - 7	0 - 5
Atividade Enzimática:										
Fosfatase alcalina	+	+	w	w	-	+	w	+	-	-
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Leucina arilamidase	+	+	+	w	+	+	w	+	+	+
Valina arilamidase	w	+	-	-	w	-	-	-	w	w

Tabela 6. Continuação.

Linhagens: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cistina	-	W	W	-	W	-	-	-	-	W
arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alfa- quimiotripsina	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-
Fosfatase ácida	-	-	+	+	+	+	W	+	-	-
Fosfolidrolase AS-BI Naftol	+	-	+	W	+	+	W	W	W	W
Alfa- galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-
Beta- galactosidase	+	W	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta- glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alfa-glucosidase	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta- glucosidase	W	+	W	W	+	+	+	+	W	W
N-acetil-beta- glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alfa- mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 6. Continuação.

Linhas: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alfa-fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradação de:										
Ácido Nalidíxico	+		+	+	+	+	-	+	nd	nd
Amido	+	-	+	+	+	-	+	-	nd	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	+
Celulose	+	nd	+	+	+	+	+	-	nd	
Gelatina	+	+	-	-	-	-	+	+	nd	+
Guanina	-	nd	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Hipoxantina	+	-	+	+	+	+	+	-	nd	nd
Pectina	-	nd	+	-	+	+	-	-	nd	nd
Tween 20	-	nd	+	-	-	-	-	+	nd	+
Tween 40	+	nd	+	-	+	+	-	+	nd	nd
Tween 60	-	nd	+	-	+	+	-	-	nd	nd
Tween 80	-	nd	-	-	+	+	-	-	nd	+
Xantina	+	-	+	+	+	+	+	-	nd	nd
Xilano	+	nd	+	+	+	+	+	-	nd	nd

Tabela 6. Continuação.

Linhas: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Utilização de:									nd	
Ácido Láctico	-	nd	-	-	-	+	+	+	nd	+
Ácido Máfico	-	nd	+	+	+	+	-	+	nd	+
Ácido Oxálico	-	nd	-	-	+	+	-	-	nd	nd
Ácido Úrico	-	nd	-	-	+	+	-	-	nd	nd
Adonitol	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	-
Celubiose	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Dextrina	-	nd	nd	-	-	-	+	+	nd	nd
Eritritol-meso	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Frutose	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Galactose	w	+	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Glicerol	-	+	-	+	-	-	+	+	nd	nd
Glicogênio	±	nd	-	-	-	-	+	+	nd	+
Inusitol	-	nd	-	-	-	-	+	+	nd	-
Lactose	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Maltose	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	+

Tabela 6. Continuação.

Linhagens: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Manitol	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	+
Manose	-	+	-	w	-	-	+	+	nd	+
Rafinose	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Ramanose	±	-	-	-	-	-	+	+	nd	-
Ribose	-	+	+	-	-	-	+	+	nd	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	+
Xilose	-	+	-	-	-	-	+	+	nd	nd
Conteúdo G+C (%mol)	74,3	72,4	73,3	71,3	73,1	nd	70,5	69	73,7	70,9
Origem do isolamento	Esponja <i>Glodia corticostylifera</i>	Sedimento praia	Esponja <i>Amphimedon viridis</i>	Esponja <i>Glodia corticostylifera</i>	Esponja <i>Glodia corticostylifera</i>	Solo contaminado por óleo	Ascidia <i>Didemnum</i> sp.	solo	Alga <i>Sargassum</i>	Dejeito de suínos
Meio isolamento	M1	Amido/caseína	TSA	M1	M1	BHI	M1	-	TSA	TSB

Tabela 6. Continuação.

Linhas: **1.** Isolado B374^T; **2.** *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (LEE, 2007); **3.** Isolado B138; **4.** Isolado B375; **5.** Isolado B452; **6.** *Williamsia serinedens* IMMIB SR-4^T (YASSIN et al., 2007); **7.** Isolado 204; **8.** *Gordonia terrae* NBRC 100016^T; **9.** Isolado B175; **10.** *Knoellia flava* TL1^T (YU et al., 2012).

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lipídios polares*	PI, PG, DPG, PME	DPG, PG, PI, PL	DPG, PG, PE, PI, PIDM	nd	nd	PG, DPG, PI, PME	nd	nd	nd	DPG, PE, PI, PL
Menaquinonas	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-8(H4)	MK-8(H4)
Ácidos graxos (>10%)**	C16:0, C17:0, C17:1 ω8c, C18:1 ω9c; Feature 3	C16:0, C18:1 ω9c	C16:0; 18:1 w9c; C18:0 10-metil; Feature 3	C16:0; 18:1 w9c; C18:0 10-metil; Feature 3	C15:0 anteiso; C16:0 iso; C 17:0 anteiso;	C16:0; 18:1 w9c; C18:0 C18:0 10-metil; Feature 3	C16:0; 18:1 w9c; 18:0 10-metil; Feature 3	C16:0; 16:1 cis9; C18:1; C18:0 10-metil;	C15:0 iso; C16:0 iso; C17:1 w8c; C17:0	C15:0 iso; C16:0 iso; C17:1 w8c

*DPG: Difosfatidilglicerol; PC: Fosfatidilcolina; PG: Fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; PL: fosfatidilinositol; PME: fosfatidimetiletanolamina; PIDM: fosfatidilinositol dimanose; GL: glicolípido desconhecido. **ácidos graxos que não podem ser separados por CG com o sistema MIDI, Feature 3 (16:1 ω7c / 16:1 ω6c - 16:1 ω6c / 16:1 ω7c). W = baixo crescimento; nd = não determinado.

Tabela 6. Continuação.

Linagens: **11.** Isolado B742; **12.** *Janibacter indicus* 0704P10-1^T (ZHANG et al., 2014); **13.** *Janibacter terrae* CS12^T (YOON et al., 2000); **14.** Isolado B366; **15.** *Kineococcus endophytica* KLBMP 1274^T (BIAN et al., 2012); **16.** Isolado B736; **17.** *Serinicoccus profundus* MCCC 1A05965^T (XIAO, XIE, XU, 2011).

Características	11	12	13	14	15	16	17
Coloração colônia	Creme	Creme	Creme	Laranja	Laranja	Creme	Creme
Temperatura (° C)	10-37	10-37	10-37	10-37	10-37	10-37	10-37
pH	6 - 10	4 - 10	5 - 10	4 - 10	nd	5 - 10	nd
Concentração de NaCl (%)	0 - 7	0 - 7	8,0	0 - 7	nd	0 - 7	nd
Atividade Enzimática							
Fosfatase alcalina	+	nd	+	+	nd	-	nd
Esterase (C4)	+	nd	+	w	nd	-	nd
Esterase lipase (C8)	+	nd	+	-	nd	-	nd
Lipase (C14)	-	nd	-	-	nd	-	nd
Leucina arilamidase	+	nd	-	+	nd	-	nd
Valina arilamidase	-	nd	-	-	nd	w	nd
Cistina arilamidase	-	nd	-	-	nd	w	nd
Tripsina	w	nd	-	-	nd	-	nd
Alfa-quimiotripsina	+	nd	-	-	nd	-	nd
Fosfatase ácida	+	nd	w	+	nd	-	nd
Fosfodrolase AS-BI	w	nd	w	w	nd	-	nd
Naftol							

Tabela 6. Continuação.

Linagens: **11.** Isolado B742; **12.** *Janibacter indicus* 0704P10-1^T (ZHANG et al., 2014); **13.** *Janibacter terrae* CS12^T (YOON et al., 2000); **14.** Isolado B366; **15.** *Kineococcus endophytica* KLBMP 1274^T (BIAN et al., 2012); **16.** Isolado B736; **17.** *Serinicoccus profundus* MCCC 1A05965^T (XIAO, XIE, XU, 2011).

Características	11	12	13	14	15	16	17
Alfa-galactosidase	-	nd	-	-	nd	w	nd
Beta-galactosidase	-	nd	-	w	nd	-	nd
Beta glucuronidase	-	nd	-	-	nd	-	nd
Alfa-glucosidase	+	nd	+	w	nd	-	nd
Beta-glucosidase	-	nd	-	w	nd	w	nd
N-acetil-beta-glucosaminidase	-	nd	-	-	nd	-	nd
Alfa-mannosidase	-	nd	-	-	nd	-	nd
Alfa-fucosidase	-	nd	-	-	nd	-	nd
Degradação de:							
Ácido Nalidíxico	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Amido	+	nd	-	nd	nd	nd	nd
Caseína	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Celulose	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Gelatina	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Guanina	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Hipoxantina	+	nd	-	nd	nd	nd	nd
Pectina	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Tween 20	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Tween 40	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Tween 60	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Tween 80	-	nd	-	nd	nd	nd	nd

Tabela 6. Continuação.

Linagens: **11.** Isolado B742; **12.** *Janibacter indicus* 0704P10-1^T (ZHANG et al., 2014); **13.** *Janibacter terrae* CS12^T (YOON et al., 2000); **14.** Isolado B366; **15.** *Kineococcus endophytica* KLBMP 1274^T (BIAN et al., 2012); **16.** Isolado B736; **17.** *Serinicoccus profundus* MCCC 1A05965^T (XIAO, XIE, XU, 2011).

Características	11	12	13	14	15	16	17
Xantina	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Xilano	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Utilização de:							
Ácido Láctico	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Ácido Málico	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Ácido Oxálico	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Ácido Úrico	-	nd	-	nd	nd	nd	nd
Adonitol	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Arabinose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Celubiose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Dextrina	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Erithritol-meso	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Frutose	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Galactose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Glicerol	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Glicogênio	W	nd	+	nd	nd	nd	nd
Inusitol	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Lactose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Maltose	+	nd	+	nd	nd	nd	nd
Manitol	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Manose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Rafinose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd

Tabela 6. Continuação.

Linagens: **11.** Isolado B742; **12.** *Janibacter indicus* 0704P10-1^T (ZHANG et al., 2014); **13.** *Janibacter terrae* CS12^T (YOON et al., 2000); **14.** Isolado B366; **15.** *Kineococcus endophytica* KLBMP 1274^T (BIAN et al., 2012); **16.** Isolado B736; **17.** *Serrinococcus profundus* MCCC 1A05965^T (XIAO, XIE, XU, 2011).

Características	11	12	13	14	15	16	17
Ramnose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Ribose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Sorbitol	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Xilose	-	nd	+	nd	nd	nd	nd
Conteúdo G+C (%mol)	71,0	nd	69,0	75,2	73,4	68,9	72,0
Origem do isolamento	Água do mar	Sedimento hidrotermal-Oceano Indico	Solo ao redor estação tratamento	Esponja <i>Micalia laxissima</i>	halophytic plant (<i>Limonium sinense</i>)	Água do mar	Sedimento mar profundo
Meio isolamento	M1	-	Meio R	M1	-	TSA	Oligotrófico
Lipídios polares*	Nd	PL, DPG, PG, PI	DPG, PG, PI	nd	DPG, PG, PI, PIDM, PL, GL	nd	PG, DPG, PC, PI, GL
Menaquinonas	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-9(H2)	MK-9(H2)	MK-8(H4)	MK-8(H4)
Ácidos graxos (>10%)	C16:0 iso; C17:1 w8c; C17:0 10-metil	C16:0 iso; C17:1 w8c; C18:1 w9c; C17:0 anteiso.	C16:0 iso, C18:1 w9c; C17:0 anteiso.	C15:0 anteiso	C15:0 anteiso; C14:0 iso	C15:0 anteiso; C14:0 iso;	C15:0 iso; C16:0 iso;

*DPG: Difosfatidilglicerol; PC: Fosfatidilcolina; PG: Fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; PL: Fosfolípido desconhecido; PME: fosfatidilmetiletanolamina; PIDM: fosfatidilinositol dimanose; GL: glicolípido desconhecido. **ácidos graxos que não podem ser separados por CG com o sistema MIDI. Feature 3 (16:1 ω7c / 16:1 ω6c - 16:1 ω6c / 16:1 ω7c).

w = baixo crescimento; nd = não determinado.

O gênero *Serinicoccus* (família Intrasporangiaceae, subordem Micrococccineae) proposto por Yi et al. (2004), possui três espécies descritas válidas, *S. marinus* e *S. profundie*, *S. chungangensis* (TRAIWAN et al., 2011), isoladas de ambiente marinho (água do mar, sedimentos profundo e de maré). São estritamente aeróbicos, moderadamente halofílicos, oxidase negativas, catalase positivas, não formam esporos, coccoides e possuem L-ornitina, alanina, lisina, ácido glutâmico e L-serina de aminoácidos na cadeia de peptidoglicano. A principal menaquinona é MK-8(H4) e os lipídios polares, fosfatidilglicerol (PG), difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilinositol (PI) e glicolipídeos desconhecidos. O resíduo de ácido murâmico da cadeia do glicano é acetilado. Outras características do gênero *Serinicoccus* são a capacidade de degradação de Tween 80 e tirosina, assim como a não degradação de xantina e hipoxantina, bem como a ausência das fosfatases ácida e alcalina, cistina arilamidase e fosfohidrolase-ABS-naftol (YI et al., 2004). O teste API-ZYM, confirmou essas características para atividade enzimática, para o isolado B736 e *S. profundie* (Tabela 6).

O gênero *Janibacter* (Família Intrasporangiaceae) descrito por Martin et al, 1997, possui dez espécies válidas, com grande diversidade biológica, isoladas de diversos ambientes (marinho, ambientes poluídos, insetos), e importantes para biorremediação. São características das espécies do gênero: são aeróbicos, não esporulam, oxidase variável, catalase positivas, não formam esporos, coccoides, podendo ocorrer pequenos bastonetes irregulares. A principal menaquinona é MK-8(H4), meso-A2pm como ácido diaminopimélico e o resíduo de ácido murâmico da cadeia do glicano é acetilado. Os lipídios polares são fosfatidilglicerol (PG), difosfatidilglicerol (DPG) e fosfatidilinositol (PI). Ainda possuem glicose, manose e ribose como açúcares de parede. Ácidos micólicos são ausentes.

O gênero *Marmoricola*, (Família Nocardioidaceae) proposto por Urzi et al. (2000), possui 5 espécies descritas, também de diferentes fontes de isolamento (solo, cinzas vulcânicas, mármore, sedimento marinho). São quimiorganotróficos, esféricos, não móveis, não esporulam. Possuem ácido LL-2,6 diaminopimélico, MK-8(H4) como principal menaquinona e fosfolipídeos característicos, fosfatidilglicerol (PG), difosfatidilglicerol (DPG) e fosfatidilinositol (PI), podendo aparecer fosfatidilcolina (PC). Ácidos micólicos ausentes.

O gênero *Williamsia* descrito por Kämpfer et al. (1999), membro da família *Gordoniaceae*, sub-ordem *Corynebacterineae* (STACKEBRANDT et al., 1997), possui nove espécies descritas válidas, dentre essas duas foram isoladas de ambiente marinho,

W. maris (STACH et al., 2004) e *W. marianensis* (PATHOM-AREE et al., 2006). As espécies de *Williamsia* formam um clado distinto dentro de um grupo de actinomicetos que contém ácidos micólicos de cadeias curtas (C50 – C56). As principais características para espécies do gênero são: aeróbios e quimioheterotróficos. Possui ácido meso-diaminopimérico, arabinose, galactose, manose e ribose como principais açúcares de parede, MK-9(H2) como principal menaquinona e fosfolípídeos característicos, fosfatidilglicerol (PG), difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidiletanolamina (PE).

O gênero *Kineococcus*, proposto por Yokota et al. (1993), possui oito espécies descritas, sendo uma de origem de ambiente marinho, *K. marinus* (LEE et al., 2006). Caracterizadas por serem aeróbicas estritas, catalase e uréase positivas, oxidase negativa, MK-9(H2) como menaquinona, e DPG (difosfatidilglicerol), PG(fosfatidilglicerol) e GL (glicídios desconhecidos), como lipídeos polares. Ácidos micólicos ausentes.

O gênero *Knoellia* (Familia Intrasporangiaceae) descrito por Groth et al. (2002), possui cinco espécies válidas, isoladas de ambientes como solo, caverna, dejetos de suínos e ar. São características das espécies do gênero: são aeróbicos a microaeróbicos, não esporulam, oxidase negativas e catalase positivas, cocos e/ou bastonetes irregulares (ciclo bastonete-cocos), A principal menaquinona é MK-8(H4), podendo aparecer traços de MK-7(H4) e MK-6(H4), meso-A2pm como ácido diaminopimérico e o resíduo de ácido murâmico da cadeia do glicano é acetilado. Os lipídios polares são fosfatidiletanolamina (PE), difosfatidilglicerol (DPG) e fosfatidilinositol (PI), podendo ocorrer em menor quantidade o fosfatidilglicerol (PG). Ácidos micólicos são ausentes.

O gênero *Gordonia* (Familia Nocardiaceae) descrito por Tsukamura (1971), compreende espécies gram-positivas a gram-variáveis, ricos em ácido meso-aminopimérico, arabinose e galactose, possuem ácidos murâmicos N-glicosilados, menaquinonas MK-9(H2). Os lipídios polares são fosfatidiletanolamina (PE), difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilinositol manosídeo. Ácidos micólicos possuem de 46 a 7 carbonos. São amplamente distribuídas e abientes aquáticos e terrestres, principalmente em solos, sedimentos marinhos e sistemas de tratamento de água.

Os resultados da caracterização fenotípica, quimiotaxonômica e bioquímica (Tabela 5) estão congruentes com as características descritas para as espécies pertencentes aos gêneros em questão.

A taxonomia polifásica resultou na identificação de nove novas espécies de actinomicetos, com a descrição da *Marmoricola aguaticus* B374^T. Ainda, o estudo da diversidade dos micro-organismos associados a macro-organismos marinhos, revelou grande diversidade de actinomicetos, com a possibilidade de mais novas espécies a serem estudadas e descritas.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bian, G.-K., Feng, Z.-Z., Qin, S., Xing, H., Wang, Z., Cao, C. -L., Liu, C. -H., Dai, C.-C., Jiang, J. -H. (2012) *Kineococcus endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal halophyte in Jiangsu, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(4): 621-628.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T. (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 447–460.
- Bredholt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P., Zotchev, S. B. (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Mar Drugs*, 6: 1124 pp.
- Carro, L., Spröer, C., Alonso, P., Trujillo, M. E. (2012) Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol*, 35: 73–80.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E., Bisgaard, M., (2004) Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 1601–1609.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Busse, H. J., Frederiksen, W. C., Bisgaard, M. (2007) Proposed minimal standards for the description of genera species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 166-178.
- Chun J. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. Ph. D. Thesis) - Department of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England, 1995.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 2259-2261.
- Chun, J., Goodfellow, M. (1995). A phylogenetic analysis of genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 45: 240–245.
- Cohan, F. M., Perry, E. B. (2007) A Systematics for Discovering the Fundamental Units of Bacterial Diversity. *Current Biology*, 17(5): 373–386.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., Alderson, G. (1985) Menaquinone composition of mycolic acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. *J Appl Bacteriol*, 58: 77-86.
- Collins, M. D. Isoprenoid quinones. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, (Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. Chichester), Wiley, 1994, pp. 265-309.

- Curtis, S. M., Meyers, P. R. (1989) Multilocus sequence analysis of the actinobacterial genus *Kribbella*. *Syst Appl Microbiol*, 35(7): 441-446.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Embley, T. M., Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 48: 257-289.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N Y)*, 39: 783-791.
- Fitch, W. M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology. *Syst Biol*, 20: 406-416.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. *Taxonomic Outline Of The Prokaryotes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 Ed. New York: Springer-Verlag, 2003.
- Gonçalves, E. R., Rosato, Y. B. (2000) Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 811-821.
- Gonzalez, J. M., Saiz-Jimenez, C. (2002) A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environ Microbiol*, 4: 770-773.
- Gonzalez, J. M., Saiz-Jimenez, C. (2005) A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles*, 9: 75-79.
- Goodfellow, M., Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 119-142.
- Goodfellow, M.; O'donnell, A. G. Chemosystematics: current state and future prospects. In: Goodfellow, M.; O'donnell, A. G. (Ed.). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.
- Gordon, R. E., Mihm, J. M. (1962). The type species of the genus *Nocardia*. *J Gen Microbiol*, 27: 1-10.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E., Pang, C. H. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol*, 24: 54-63.
- Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K., Rainey, F. A. (1996). *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 234-239.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y. (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J Syst Evol Microbiol*, 58: 149-159.
- Jones, K. L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol*, 57: 141-145.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3233-3241.
- Hunter-Cevera, J. C., Belt, A. *Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry*. London, Academic Press, 1996, 263 p.
- Kageyama, A., Iida, S., Yazawa, K., Kudo, T., Suzuki, S., Koga, T., Saito, H., Inagawa, H., Wada, A., Kroppenstedt, R. M., Mikami, Y. (2006) *Gordonia araii* sp. nov. and *Gordonia*

- effusa* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 1817-1821.
- Kämpfer, P., Anderson, M. A., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M., Salkinoja-Salonen, M. (1999) *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 681-687.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. Evolution of protein molecules. In: Munro, HN eds. Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, 1969, pp. 21-123.
- Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow M, Stackebrandt E (Ed). Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Chichester, John Wiley & Sons, 1991, pp 115-147.
- Lee, S. D. (2007) *Marmoricola aequoreus* sp.nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 1391–1395.
- Lee, S. D. (2006) *Nocardia jejuensis* sp. Nov., a novel Actinomycetes isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 559-562.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62: 716-721.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z., Swings, J. (2002). The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 823-829.
- Lechevalier, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Holt, G. H et al.,eds. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins,1994. p. 611-623.
- Xiao, J., Luo, Y., Xie, S., Xu, J. (2011) *Serinicoccus profundus* sp. nov., an actinomycete isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus *Serinicoccus*, *Int J SystEvol Microbiol*, 61(1): 16 - 19.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3140-3145.
- Maiden, M. C. J. (2006) Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60: 561-588
- Martin, K., Schumann, P., Rainey, F. A., Schuetze, B., Groth, I. (1997) *Janibacter limosus* gen. nov., sp. nov., a new actinomycete with meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 529-534.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., DeVos, P., Willems, A. (2008) Advantages of MultiLocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 58: 200–214.
- Meier-Kolthoff, J., Göker, M., Spröer, C., Klenk, H.P. (2013) When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol*, 195: 413–418.
- Menezes, C.B.A: Análise da diversidade genética por MLSA e avaliação da atividade antitumoral de linhagens de *Chromobacterium* sp. Dissertation. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., Berlinck, R. G. S., Sette, L. D. (2010) Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res*, 165(6): 466-82.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A., Parlett, J. H. (1984) An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods*, 2: 233-241.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151: 2141-2150.
- Pathom-aree W, Stach JE, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M (2006) Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10:181-9.
- Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 101-110.
- Roller, C., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1992) Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23s rRNA genes. *J General Microbiol*, 138(1): 167-175.
- Rong, X., Gou, Y., Huang, Y. (2009) Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *Solvifaciens*. *Syst. Appl. Microbiol*, 32: 314-322.
- Rong, X., Huang, Y. (2010) Taxonomic evaluation of *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to reduce 29 species and subspecies to 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 696-703.
- Rong, X., Liu, N., Ruan, J., Huang, Y. (2010). Multilocus sequence analysis of *Streptomyces griseus* isolates delineating intraspecific diversity in terms of both taxonomy and biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 237-248.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25: 39-67.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365-386.
- Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Tech. Note 101. Microbial ID, Newark, 1990.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 404-425.
- Schaal, K. P.. Identification of clinically significant actinomycetes and related 182 bacteria using chemical techniques. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, (Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin). London: Academic Press, 1985.
- Schleifer, K. H., Whitman, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. New York: Springer, 2009, pp. 359-381.
- Traiwon, J., Park, M. H., Kim, W. (2011). *Serinicoccus chungangensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of the genus *Serinicoccus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(6): 1299-1303.

- Schutter, M. E., Dick, R. P. (2000) Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities Soil. *Science Society of America Journal*, 64: 1659-1668.
- Siegrist, T. J., Anderson, P. D., Huen, W. H., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., Sandrin, T. R. (2007). Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J Microbiol Methods*, 68: 554-562.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15-22.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M. & Bull, A. T. (2003). New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol*, 5: 828-841.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. (2004) *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 191-194.
- Stackebrandt, E., Charfreitag, O. (1990) Partial 16S rRNA primary structure of five *Actinomyces* species: Phylogenetic implications and development of an *Actinomyces israelii* specific oligonucleotide probe. *Journal Of General Microbiology*, 136(1): 37-43.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int J Syst Bacteriol*, 47: 479–491.
- Staneck, J. L., Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Environ Microbiol*, 28: 226-231.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. J. (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Uchida K, Kudo T, Suzuki K, Nakase T (1999) A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. *J Gen Appl Microbiol*, 45: 49-56.
- Van Soolinger D., De Haas PEW., Hermans PWM, Groenen P., Van Embden JDA. (1993) Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiology*, 31: 1987-1995.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60: 407-438.
- Yassin, AF, Young CC, Lai WA, Hupfer H, Arun AB, Shen FT, Rekha PD, Ho MJ. (2007) *Williamsia serinedens* sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(3): 558-561.
- Yu, X., Du, Y., Wang, G. (2012) *Knoellia flava* sp. nov., isolated from pig manure. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(2): 384-389.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., Fargier, E. (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 366-377.

- Zhang G, Ren H, Wang S, Chen X, Yang Y, Zhang Y, Jiang Y. (2014) *Janibacter indicus* sp. nov., isolated from hydrothermal sediment of the Indian Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(7): 2353-2357.
- Ward, A. C., Goodfellow, M. Phylogeny and functionality: taxonomy as a roadmap to genes. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*, (Edited by A. T. Bull). Washington, D.C.: ASM Press., 2004, pp. 288-313.
- Wayne, L.G.; Brenner, D.J.; Colwell, R.R.; Grimont, P.A.D.; Kandler, O.; Krichevsky, M.I.; Moore, L.H.; Moore, W.E.C.; Murray, R.G.E.; Stackebrandt, E.; Starr, M.P.; Trupper, H.G. (1987) International Committee on Systematic Bacteriology Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 463-464.
- Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., Stackebrandt, E. (2000) *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family Nocardioideae isolated from a marble statue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 50: 529-536.
- Zhang H.; Lee YK.; Zhang W.; Lee HK. (2006) Culturable Actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleве*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90: 159–169.
- Yokota, A., Tamura, T., Nishi, T, Hasegawa, T. (1993) *Kineococcus aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic, gram-positive, motile coccus with meso-diaminopimelic acid and arabinogalactan in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 52-57.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS ACTINOBACTÉRIAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIVIRAL

3.1. INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos medicamentos a partir de recursos naturais tornou-se uma tendência global (RAVIKUMAR et al., 2011). Nos últimos anos, pesquisas envolvendo organismos marinhos têm contribuído significativamente para a descoberta de novas substâncias potencialmente bioativas para fins terapêuticos (BERDY et al., 2012). Em relação a doenças infecciosas, devido a resistência de vários micro-organismos aos tratamentos existentes, a exploração do ambiente marinho representa promissora estratégia na busca de novos compostos ativos, devido à diversidade estrutural e atividades biológicas únicas dos seus metabolitos secundários. Importantes novas fontes de actinomicetos incluem o oceano (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010), sedimentos (JENSEN et al., 2005^a, JENSEN et al., 2005b) e simbiose de organismos marinhos, principalmente esponjas e corais (JIANG et al., 2007, KURAHASHI et al., 2010)

Membros da classe Actinobacteria são produtores de vários metabolitos secundários biologicamente ativos (45%), sendo 80% oriundos do gênero *Streptomyces* (BÉRDY, 2005; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2007), por exemplo, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces griseus*, e *Streptomyces hygroscopicus* produzem 13, 32 e 46 diferentes compostos, respectivamente, e algumas espécies de *Streptomyces hygroscopicus* produzem bialofos, higromicina, espectinomicina, rapamicina e outros antibióticos. Embora, apenas 10% do número total de produtos naturais, produzidos por estes organismos, foram descobertos (WATVE et al., 2001). Ainda, são comuns produtores de antibióticos espécies dos gêneros: *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* e *Streptosporangium*. Existem os antimicrobianos de importância comercial, produzidos por raros actinomicetos, tais como eritromicina produzida por *Saccharopolyspora erythraea* (OLIYNYK et al., 2007), gentamicina por *Micromonospora purpurea* (WEINSTEIN et al., 1963; WAGMAN; WEINSTEIN, 1980), rifamicinas por *Amycolatopsis mediterranei* (JIN et al., 2002), teicoplanina por *Actinoplanes teichomyceticus* (Jung et al., 2009) e vancomicina por *Amycolatopsis orientalis* (WINK et al., 2003). Diversos trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de actinomicetos isolados de ambientes marinhos. Eltamanya et al. (2014) relatou atividade antimicrobiana de *Micrococcus* isolados de esponja marinha.

Quanto à atividade antiviral, são poucas as descrições de atividade antiviral por actinobacterias. Kumar et al. (2006) avaliaram atividade antiviral de isolados de

actinobactérias, isolados de ambiente marinho, contra vírus da síndrome do ponto branco (WSSV), em camarões. Nair (2012) também encontrou sete isolados de actinomicetos com atividade contra WSSV, pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Brevibacterium* e *Nocardia*. Alguns compostos com atividade antiviral de actinobactérias tem sido descritos, tais Pentalactonas (*Streptomyces*), ácido pirrol -2 – carboxílico, ativos contra vírus de DNA. Um outro exemplos de bioproduto marinhos desenvolvido com atividade antiviral são Ara-A (vidarabina) e Ara-C (citarabina), derivados de esponja *Tethya cripta* (YASUHARA-BELL et al., 2010).

Recentemente, a taxa de descoberta de novos compostos a partir de gêneros existentes, obtidos de habitats bem explorados, como o solo comum, diminuiu, portanto, é fundamental que novas actinobactérias, de habitats inexplorados, como marinho, sejam consideradas como fontes de novos antibióticos e outros compostos bioativos.

Nesse sentido, o objetivo desse capítulo foi avaliar as atividades antimicrobiana e antiviral dos extratos brutos das actinobactérias.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO

Extratos derivados do metabolismo dos isolados de actinobactérias foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido. Um pré-inóculo dos isolados foi feito em 7 mL do meio de isolamento (Tabelas S1 e S3, Apêndices II e IV) e incubados a 30 °C por 48 h a 150 rpm. Após o crescimento da cultura, o volume total foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL do mesmo meio e mantido na mesma temperatura e rotação por 12 h. Novamente, 50 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para quatro frascos de vidro contendo 500 mL do mesmo meio e mantidos nas mesmas condições citadas acima por três semanas. Após esse período 500 mL de acetato de etila foi adicionado e a mistura triturada em liquidificador de alta rotação e, em seguida, mantida sob agitação a 100 rpm por 12 h.

Os extratos brutos foram filtrados em funil de Buchner contendo uma camada de celite. Após separação das fases orgânicas e aquosas, a fase orgânica foi transferida para balão de fundo redondo. Os extratos brutos foram concentrados no rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi) a vácuo e temperatura de 30 °C até completa secagem do solvente. Para a separação de alíquotas do extrato bruto, foi adicionado o solvente de extração (acetato de etila) e dividido em três frascos de vidro, os quais foram concentrados em rotaevaporador

(Rotavapor R-215 Buchi) a vácuo e temperatura de 30 °C. A cada alíquota foi adicionado acetato de etila, homogeneizadas em banho de ultrassom, filtradas em algodão, transferidas para novos frascos de vidro e concentradas em centrífuga a vácuo (Savant Speedvac^âPlus SC 210^a) com refrigeração (RVT4104 refrigerated Vapor Trap), até completa secagem do solvente, e armazenadas a – 20 °C. Cada alíquota do extrato bruto foi encaminhado para os ensaios de atividades: antimicrobiana e antiviral.

3.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita em colaboração com a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte na Divisão de Microbiologia, CPQBA/UNICAMP, conforme método de Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2003).

Para os testes de atividade antimicrobiana, os 72 extratos de actinobactérias foram solubilizados em DMSO a 10 % no meio de cultivo Mueller-Hinton. A concentração máxima testada foi de 2 mg/mL.

A atividade antimicrobiana dos extratos dos isolados de actinobactérias em estudo foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Candida albicans* ATCC10231. Os micro-organismos foram preservados em meios de cultura específicos, meio Mueller-Hinton para bactérias e meio RPMI-1640 para a levedura *C. albicans*, repicados 24 h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em estufa a 37 °C para crescimento. Os inoculos dos diferentes micro-organismos alvo foram preparados a partir de suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução de NaCl a 0,8%, sendo a densidade ótica acertada em espectrofotômetro até turbidez correspondente a solução de Mc Farland 0,5 a 625 nm (Abs entre 0,08 e 0,1), seguido da diluição indicada para cada tipo de micro-organismo, no meio de cultura.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada, em duplicata, pelo método de Microdiluição. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL dos meios de cultura citados acima, sendo a coluna 12 utilizada para o controle dos micro-organismos e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 – linha A, foram acrescentados 100 µL do extrato a ser testado e diluições sucessivas foram obtidas transferindo-se 100 µL para o poço adjacente, resultando nas seguintes concentrações do extrato bruto: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,065, 0,03125, 0,015625, 0,0078125, 0,0039,

0,00195 e 0,0009765 mg/mL. Em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada de micro-organismo alvo, cuja concentração final foi de 10^4 células.mL⁻¹. As microplacas foram seladas com as tampas plásticas e parafilm® e incubadas por 24 h a 37 °C. Após este período as placas foram avaliadas e a CIM definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento dos micro-organismos.

Foram inseridos três controles no teste, sendo: o (1) controle negativo, que possui apenas o meio de cultivo Muller-Hinton, sem a suspensão de micro-organismos, (2) o controle positivo que possui o inóculo de micro-organismo sem extrato e (3) o meio de cultivo com o” o extrato, considerado “controle Branco”. A leitura dos resultados deu-se conforme abaixo:

- Bactérias: Após o período de incubação foram adicionados 50 uL da solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) e as placas re-incubadas por 3 h. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) é definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células bacterianas apresentam atividade respiratória.
- Levedura: Após o período de incubação foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada ao avaliar o crescimento dos micro-organismos indicadores em meio de cultivo sólido, Mueller-Hinton Ágar para bactérias e meio Sabourad Dextrose Ágar para *C. albicans*. Após ser obtido o resultado da CIM, um conteúdo de cada poço foi coletado com alça de platina e plaqueado sob o meio de cultivo específico. Após 24 a 36 h de incubação a 37 °C foi avaliado o crescimento dos micro-organismos em cada poço. O resultado foi obtido após verificar uma concentração mínima do extrato bruto do qual não foi observado o crescimento de micro-organismos.

3.2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A avaliação da atividade antiviral dos extratos brutos dos isolados de actinobactérias foi feita em colaboração com a Dra. Luciana Konecny Kohn, a qual desenvolveu metodologia para triagem de extratos biológicos frente a vírus animais, durante seu pós-doutorado financiado pela FAPESP, no Laboratório de Virologia Animal, IB, UNICAMP.

A avaliação *in vitro* da atividade antiviral baseia-se na habilidade do vírus se replicar nas células hospedeiras (CÓS, et al. 2006; SMEE et al., 2002). Todos os vírus estudados induzem o efeito citopático (ECP) nas células que pode ser observado microscopicamente. O efeito citopático consiste de alterações que ocorrem nas células e consiste em células arredondadas, desorganização celular (aumento nuclear, a variação da morfologia celular, a perda do padrão da cromatina, as inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas ou a multinucleação), morte e conseqüente observação de que células em monocamada, aderidas à garrafa de cultivo celular, passam a ser observadas em suspensão. O ECP produzido depende do vírus como da célula hospedeira utilizada para o seu isolamento e identificação. Estas alterações são decorrentes da inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas celulares, da fusão de células, da liberação de enzimas do lisossoma, das modificações na permeabilidade celular, das modificações nas estruturas intracelulares e aberrações cromossômicas.

Cabe ressaltar que três dos vírus, Herpes vírus bovino tipo I, Metapneumovirus aviário (aMPV) e Parvovírus suíno pertencem a Famílias que possuem representantes que causam graves infecções também nos humanos e foi incluído no estudo o vírus o herpes vírus simplex do tipo 1 (HSV-1), agente etiológico da herpes labial em humanos. Os vírus e linhagens celulares selecionados para este estudo estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Vírus e linhagens celulares utilizados no estudo.

Vírus	Linhagem viral	Linhagem celular	Vírus Humano
Herpesvírus Bovino tipo 1	BHV-1 <i>Los Angeles</i> (LA) (Madin et al., 1956)	CRIB (rim bovino)	Herpes humano 1, irus Epstein Barr e irus Varicella-zoster
Metapneumovirus aviário (aMPV)	SHS/BR121 (Arns e Hafez, 1995, Dani et al., 1999, D'Arce et al., 2005)	CER (Chicken Embryo Related) Prof. Dr. H.M.Hafez do Laboratório Estadual de Stuttgart/Alemanha	Sarampo, Caxumba e Influenza
Calicivírus Felino (FCV)	FCV	Célula CrFK	-

Tabela 7. Continuação.

Vírus	Linhagem viral	Linhagem celular	Vírus Humano
Parvovírus suíno	PPVS	Célula CrFK	respiratórias e conjuntivite, respiratórias por bocavírus, genitais e cutâneas por papilomavírus
HSV1 cepa KOS	Faculdade de Farmácia da Universidade de Rennes, França	VERO (fibroblastos de rins do macaco verde) (Departamento de Virologia Clínica, Göteborg University, Suécia)	etiológico da herpes labial em humanos, é facilmente transmitido e têm o grande problema de causar infecções latentes

3.2.3.1. MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS

As amostras virais foram inoculadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² e quando a monocamada apresentou 70% de efeito citopático (ECP), esta foi raspada e vigorosamente agitada até a dissolução dos grumos celulares, então alíquotas de 1 a 2 mL contendo a mistura vírus-célula foram separadas em tubos de crioconservação. Estoques de vírus portando 10⁵ doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares (DICC₅₀) por 50 µL foram estocadas a -70°C para uso posterior.

3.2.3.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÁXIMA NÃO TÓXICA

Para a determinação das concentrações a serem utilizadas nos testes antivirais foi necessário determinar a concentração máxima não tóxica (DMNT) para as células. Pois a substância deve ser ativa somente contra o vírus para diminuir a toxicidade celular. A determinação da DMNT foi realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando a sulforodamina B (SRB).

As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos e adicionado 100 µL do extrato diluído em dimetilsulfoxido de sódio (DMSO) puro, na concentração de 0,1 mg/mL sendo esta solução mãe diluída com meio de cultura para se chegar na concentração de inoculação de 250; 25; 2,5 e 0,25 µg/mL, o volume final no compartimento é de 200 µL de

meio. Após 72 h as células foram fixadas com 50 µL de TCA 50% a 4 °C e foram incubadas por 1 h a 4 °C. A seguir foram lavadas por quatro vezes com água destilada para remoção de resíduos e secas a temperatura ambiente (SKEHAN et al., 1990).

Após a secagem as células foram coradas por 30 min com SRB a 0,4 % em 1 % de ácido acético. Decorrido este período, o excesso de corante foi removido por inversão e as células lavadas com ácido acético 1 % por 3 vezes. Após secagem das placas o corante ligado à proteína foi solubilizado com Trisbase 10 µM com pH 10,5 por 5 min em agitador de placas ou em ultrassom. A leitura da absorbância em 560 nm foi realizada em leitor de microplacas.

3.2.3.3. ENSAIO ANTIVIRAL

O teste da atividade antiviral foi avaliado inicialmente em dose única na DMNT frente a diferentes concentrações virais. O extrato foi considerado positivo se apresentou PI (porcentagem de inibição) maior que 90%.

A atividade antiviral foi realizada após titulação dos vírus de acordo com metodologias usuais, ou seja, 50 µL de células na concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/compartimento na presença dos extratos nas respectivas DMNT em quadruplicata incubadas por 1 h, seguida da adição do vírus em diluições sequenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 h, em busca do ECP característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman e Karber (LORENZ; BÖGEL, 1973).

O método de Spearman e Karber é amplamente utilizado, para o cálculo do efeito antiviral, por ser um método simples e rápido. A avaliação é visual através da observação em microscópio óptico dos compartimentos da microplaca à procura da ocorrência do Efeito Citopático (CPE). Considerando resultado negativo a ocorrência de CPE e positivo quando não apresentar o CPE isto é, o extrato inibiu a ação viral sobre a célula.

O índice de inibição viral (IIV) para cada concentração da substância foi calculado através da diferença entre o log do título do controle (C) e o log do título do tratado. Considerando como positivo se o IIV for igual ou acima de 1,5 log.

A porcentagem de inibição foi calculada através da fórmula:

$(PI) = (1 - T/C) \times 100$, onde T é o antilog dos títulos virais tratados (com extrato) e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). Foi considerado positivo a PI igual ou acima de 90%.

3.2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

O mecanismo de ação da atividade antiviral consiste na identificação da fase de replicação viral cujo extrato bruto ativo inibe o vírus. Esta avaliação foi feita com diferentes tipos de tratamentos conforme descrito a seguir:

- **Fase de adsorção (Extrato +Vírus = E+V):** As células foram previamente tratadas com os extratos brutos ativos e após 1 h de incubação foi adicionado o vírus em diferentes diluições. Este tratamento permite verificar se o extrato é capaz de produzir proteção viral ou um estado antiviral (por processo semelhante à indução de interferon), podendo estar interagindo no receptor celular impedindo a ligação deste ao vírus, interferindo com as fases de *attachement* e/ou adsorção viral.
- **Teste de inativação da partícula viral (VE):** O vírus foi tratado com o extrato e incubado por 1 h sendo, então, adicionados à placa contendo a monocamada celular, para avaliação do poder de infectividade (ECP). Com esse tratamento consegue verificar a capacidade de provocar inativação da partícula viral, ou interferência em sua habilidade de iniciar um ciclo de replicação.
- **Fase de replicação (Vírus + Extrato = V+E):** O vírus foi inoculado na célula e este incubado por 1 h, após este período o vírus provavelmente foi adsorvido pela célula e esta iniciando a replicação de suas proteínas seguida da montagem e liberação da partícula viral, portanto, quando o extrato foi adicionado, este pode ou não atuar nas etapas intracelulares da replicação viral.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana realizados contra os micro-organismos indicadores *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Candida albicans* ATCC10231 resultaram em 16 extratos brutos positivos dentre os 72 extratos brutos de actinobactérias testados (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos isolados de actinobactérias: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), em mg/mL, contra diferentes micro-organismos indicadores.

Isolados	E. coli			B. subtilis			M. luteus			S. aureus		
	CIM	CBM	CBM/CIM*	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM
B123 <i>Arthrobacter</i> sp.	0,5	> 2	> 4	1	1	1	2	2	1	1	1	1
B175 <i>Knoellia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2
B149 <i>Micrococcus</i> sp.	2	2	1	1	1	1	-	-	-	0,5	1	4
B150 <i>Micrococcus</i> sp.	2	> 2	> 1	2	2	1	-	-	-	-	-	-
B682 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
B612 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	2	2	1	-	-	-	2	> 2	> 1
B232 <i>Micrococcus</i> sp.	0,25	0,25	1	2	2	1	-	-	-	1	1	1
B382 <i>Micrococcus</i> sp.	0,03125	1	32	1	1	1	2	> 2	> 1	2	> 2	> 1
B642 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	2	2	1	-	-	-	2	> 2	> 1
B137 <i>Williamsia</i> sp.	0,03125	> 2	> 64	1	1	1	2	2	1	0,5	> 2	> 4
B138 <i>Williamsia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
B375 <i>Williamsia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1
B506 <i>Saccharopolyspora</i> sp.	0,5	> 2	> 4	1	1	1	-	-	-	2	> 2	> 1
B738 <i>Streptomyces</i> sp.	2	> 2	> 1	2	2	1	-	-	-	2	> 2	> 1
B366 <i>Kineococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	2	> 2	> 1	2	2	1
B645 <i>Streptomyces</i> sp.	0,125	> 2	> 16	1	1	1	-	-	-	0,5	0,5	1

* CBM/CIM ≤ 2,0: extrato é considerado bactericida; 2 < CBM/CIM < 16: extrato é considerado bacteriostático; CBM/CIM for ≥ 16,0 extrato é considerado inefetivo (Shanmughapriya, 2008),

Não foi observada a inibição das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente aos extratos brutos testados. Apenas o extrato bruto do isolado B101, apresentou atividade antimicrobiana com CIM e CFM de 2 mg/mL para *Candida albicans* ATCC10231. Ainda, o extrato bruto do isolado B149 apresentou atividade antimicrobiana com CIM de 2 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

De acordo com Shanmughapriya (2008), a atividade bacteriostática ou bactericida da maioria dos extratos é avaliada de acordo com a relação CBM/CIM. Se CBM/CIM for $\leq 2,0$, o extrato é considerado bactericida, caso contrário, bacteriostático, e se CBM/CIM for $\geq 16,0$ é considerado inefetivo. Dentre os extratos que apresentaram, melhores atividades de acordo com os valores de CIM (marcados de cinza escuro na Tabela 8), apenas o extrato bruto do isolado B232 pode ser considerado bactericida contra *E.coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* (CBM/CIM = 1 mg/mL) e do B149 pode ser considerado bacteriostático contra *S. aureus* (CBM/CIM = 4 mg/mL).

Em relação aos outros extratos, muitos podem ser considerados bactericidas (marcados em cinza claro na Tabela 8) de acordo com a relação CBM/CIM (SHANMUGHAPRIYA, 2008).

Dentre os isolados que apresentaram potencial atividade antimicrobiana, a maioria pertence ao gênero *Micrococcus* (sete isolados). Também apresentaram atividade antimicrobiana, três isolados do gênero *Williamsia*, dois isolados do gênero *Streptomyces* e um isolado de cada gênero *Knoellia*, *Saccharopolyspora*, *Arthrobacter* e *Kineococcus*. Observou-se, ainda, diferentes atividades antimicrobianas para os isolados do gênero *Micrococcus*, o que sugere diferentes compostos responsáveis pelas atividades ou possíveis diferentes espécies, visto que estes isolados foram identificados somente em nível de gênero. Eltamanya et al. (2014) identificaram composto, derivado de cultivo *Micrococcus* sp. EG45 isolado de esponja marinha, com atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. *Saccharopolyspora erythraea* produz eritromicina A, antibiótico de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas patogênicas (STAUTON et al., 2001).

Conforme sugerido pela análise do gene RNA ribossomal 16S, MLSA e análises quimiotaxonômicas (Figuras 4A, 8) e confirmados pela hibridação DNA-DNA, os isolados de actinobactérias B366 e B375 são considerados novas espécies. Em adição, os isolados **B138 e B175** também podem pertencer a novas espécies conforme sugerido pela análise do gene RNA ribossomal 16S e do MLSA. Esses isolados podem ser fontes

de novos metabólitos secundários, visto que a taxa de descoberta de novos compostos é realmente muito maior em novas espécies taxonômicas do que em espécies já conhecidas (PIMENTEL-ELARDO, 2008).

Os actinomicetos são amplamente distribuídos no ambiente marinho mostrando competitiva capacidade biossintética (ZHENG et al., 2000), mesmo com a dificuldade de isolamento da maioria dos actinomicetos marinhos, devido a sua baixa abundância e requerimentos nutricionais especiais. Diversos trabalhos na literatura relatam o isolamento, ou a presença por metodologias independente de cultivo, de actinomicetes a partir de esponjas marinhas (CHELOSSI et al., 2004; MONTALVO et al., 2005; WEBSTER et al., 2001). Muller (2003) tem sugerido que o papel dos micro-organismos associados a esponjas na defesa química do hospedeiro seja por metabólitos de baixo peso molecular ou ataque de toxinas ou enzimas, sugerindo a relação com o amplo potencial antimicrobiano de esponjas.

Li e Liu (2006) isolaram 23 actinomicetos a partir de esponja marinha, maioria pertencente ao gênero *Streptomyces*, e avaliaram o potencial antimicrobiano, e identificaram 20 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana de amplo espectro contra espécies indicadoras, principalmente contra *Pseudomonas fluorescens*. No presente estudo, dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, sete foram obtidos de esponjas marinhas, quatro de algas, um de ascídia e quatro a partir da amostra de água do mar. Actinomicetes associados a esponjas ou a outros organismos marinhos, como relatado nesse estudo, podem ser promissoras fontes para desenvolvimento de drogas de origem marinha.

Abdelmohsen et al. (2010) isolaram 90 actinomicetos a partir de 11 espécies de esponjas marinhas, classificados em 18 diferentes gêneros: *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Brachybacterium*, *Rubrobacter*, *Streptomyces*, *Dietzia*, *Salinispora*, *Actinokineospora*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Nocardiosis* e *Rothia*. Destes 10 isolados apresentaram atividade antimicrobiana, a maioria *Streptomyces* contra *S. aureus*. Nenhum isolado apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas. Relatamos nesse estudo atividade antimicrobiana dos isolados de *Micrococcus* sp. B149 e B232 contra *E.coli* (Gram-negativa), e assim como Abdelmohsen et al. (2010), a maioria dos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*).

Maior frequência de atividade contra bactérias Gram positivas tem sido observada na maioria dos estudos reportados (BALLANTINE et al., 1987; GERWICK et al., 1985; NURUL et al., 2010), assim como em nossos resultados, embora obtivemos atividade contra *E.coli*, assim como Nurul et al. (2010) e Li e Liu (2006) que obtiveram resultados contra isoaldos do gênero *Pseudomonas*. Em geral, substâncias antibióticas têm mais efeito inibitório contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (KUMAR et al., 2006). O principal componente na parede celular de bactérias Gram negativas são as camadas de lipopolissacarídeos com proteínas e fosfolipídios (BURN, 1988). As bactérias Gram-negativas são os patógenos mais importantes, na clínica, em comparação a bactérias Gram-positivas, portanto, o desenvolvimento de antibióticos contra bactérias Gram-negativas a partir de produtos naturais de ambiente marinho é de grande importância. O isolado B232 (*Micrococcus* sp.) apresentou promissora atividade contra *E.coli*, bactéria Gram-negativa, com valores de CIM e CBM de 0,25 mg/mL.

Newman e Shapiro (2008) concluíram que micro-organismos desempenham importante papel na identificação de compostos com atividade antitumoral. A maioria dos compostos usados para quimioterapia de tumores foi inicialmente descoberta como antibióticos produzidos por micro-organismos ou derivados destes, como actinomicina D, antraciclina (daunorrubicina, doxorrubicina), glicopeptolides (bleomicina e feomicina), temitosan e mitomicina C, antracenos, e outros. Curiosamente, uma tetraciclina de quarta geração conhecida como SF2575, produzida por *Streptomyces* sp., tem baixa atividade antibiótica, mas alto nível de atividade contra células de leucemia P388 in vitro e muitos outros tipos de células cancerígenas (PICKENS et al., 2009).

Park et al. (2009) relataram um novo antibiótico, isolado de co-cultura, presente na drenagem de uma mina abandonada, onde condições de nutrientes equivalem a um ambiente extremo, e este novo antibiótico também apresentou atividade antitumoral. Antibióticos polienos, tais como anfotericina B, são utilizados como agentes antitumorais, antiprions e contra leishmaniose. Outros produtos naturais de origem microbiana com atividade antibiótica são usados contra câncer, tais como doxorrubicina, neomicina, beta-lactâmicos, bleomicina e rapamicina (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Como um ambiente resulta nas interações defensivas e ofensivas microbianas para a sobrevivência dos micro-organismos, embora o oceano represente o centro da diversidade biológica, com 34 dos 37 filos de vida representados (em comparação com apenas 17 em terra), a prospecção dos recursos marinhos para uso biotecnológico,

principalmente para a descoberta de novas drogas, é uma atividade relativamente recente (DEMAIN; VAISHNAV 2011).

3.3.2. ATIVIDADE ANTIVIRAL

Em relação à atividade antiviral, os extratos brutos derivados do metabolismo dos 72 isolados de actinomicetos, foram testados na CMNT de 50 µg/mL. Um extrato foi considerado ativo quando a porcentagem de inibição (IP) foi superior a 90 % (Tabela 9, valores positivos destacados em negrito).

Tabela 9. Avaliação da atividade antiviral por titulação das substâncias testes a CMNT de 50 µg/mL contra diferentes vírus animal.

Antiviral Titulação – CMNT 50µg/mL %PI#													
Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1	Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1
B135 <i>Kocuria</i> sp.	68	68	99	38	99	-	B366 <i>Kineococcus</i> sp.	-	-	-	83	83	90
B136 <i>Kocuria</i> sp.	68	68	-	63	-	44	B367 <i>Brachybacterium</i> sp.	-	-	-	90	44	-
B137 <i>Williamsia</i> sp.	-	-	-	91	70	-	B373 <i>Brachybacterium</i> sp.	68	83	-	86	44	-
B138 <i>Williamsia</i> sp.	-	-	-	37	91	-	B374 <i>Marmoricola</i> aquática	83	90	47	49	-	-
B141 <i>Kocuria</i> sp.	99	44	-	-	-	44	B382 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	48	82	-
B149 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	86	89	-	B411 <i>Micrococcus</i> sp.	68	68	-	16	-	-
B150 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	43	100	44	B419 <i>Curtobacterium</i> sp.	99	44	-	-	-	-
B155 <i>Micrococcus</i> sp.	83	68	17	36	80	-	B422 Norcadioides sp.	-	44	-	54	100	-
B161 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	9	72	-	B440 <i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	-	83	-	-
B168 <i>Micrococcus</i> sp.	99	83	99	79	90	-	B452 <i>Williamsia</i> sp.	-	-	-	-	100	-

Tabela 9. Continuação.

Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1	Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1
B175 <i>Knoellia</i> sp.	83	44	35	67	75	-	B470 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	94	-	-
B177 <i>Nocardioides</i> sp.	-	-	-	40	80	-	B490 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	-	44	-
B204 <i>Gordonia</i> sp.	83	44	-	100	-	-	B506 <i>Saccharopolyspora</i> sp.	-	68	-	42	74	98
B232 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	100	86	-	B487 <i>Nocardia</i> sp.	-	-	-	68	68	-
B235 <i>Brachybacterium</i> sp.	68	68	-	39	-	-	B566 <i>Micrococcus</i> sp.	44	-	-	24	79	-
B240 <i>Micrococcus</i> sp.	68	83	-	34	-	-	B612 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	41	94	-
B248 <i>Micrococcus</i> sp.	44	68	-	77	83	-	B642 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	58	81	-
B249 <i>Micrococcus</i> sp.	44	83	-0	39	68	-	B682 <i>Micrococcus</i> sp.	90	-	-	25	100	-
B255 <i>Janibacter alkaliphilus</i>	90	83	60	71	44	-	B729 <i>Mycobacterium</i> sp.	-	-	-	97	83	44
B266 <i>Micrococcus</i> sp.	99	68	-	40	44	-	B735 <i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	68
B276 <i>Nocardia</i> sp.	68	68	-	60	50	-	B736 <i>Serinicoccus</i> sp.	44	68	-	-	-	-

Tabela 9. Continuação.

Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1	Amostra	HBV1	aMPV	PPV	BVDV	FC	Hsv1
B277 <i>Micrococcus</i> sp.	99	-	-	44	-	-	B738 <i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	44	90	-
B299 <i>Brevibacterium</i> sp.	99	-	-	-	-	-	B739 <i>Saccharopolyspora</i> sp.	-	-	-	83	-	-
B341 <i>Micrococcus</i> sp.	-	83	-	-	-	-	B742 <i>Janibacter</i> sp.	-	-	-	68	94	94
B362	-	44	-	-	-	-	B512 <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	-	-	94	-

HBV1: Herpesvírus Bovino tipo 1 (1° e 2° dias pós-infecção (dpi)); aMPV: Metapneumovírus aviário (2° e 3° dpi); PPV: titulação por MTT para o Parvovírus Canino (4° dpi); BVDV: Vírus da diarreia viral bovina; FCV: Calicivírus Felino; HSV-1: herpes vírus simplex do tipo 1; %PI: porcentagem de inibição.

O extrato bruto do isolado B374 (*Marmoricola* sp.) apresentou atividade contra o vírus aMPV, enquanto o extrato do isolado B135 (*Kocuria* sp.) apresentou atividade contra o PPV, e os extratos de B141 (*Kocuria* sp.), B266 (*Micrococcus* sp.), B277 (*Micrococcus* sp.), B299 (*Brevibacterium* sp.) e B419 (*Curtobacterium* sp.) apresentaram atividade contra o vírus HBV-1. Os isolados B168 (*Micrococcus* sp.) e B255 (*Janibacter* sp.) apresentaram atividades contra os vírus PPV e HBV-1 (Tabela 9).

Apenas os extratos brutos dos isolados B506 (*Saccharopolyspora* sp.) e B742 (*Janibacter* sp.) apresentaram atividade contra o vírus HSV-1, com 99% e 94% de inibição, respectivamente. O herpes vírus simplex do tipo 1 (HSV-1) é facilmente transmitido e representa um grande problema de saúde humana resultando numa infecção latente, já que o indivíduo infectado, passa a ser o portador do vírus por toda a vida. Neste estudo, o ensaio de atividade antiviral com o vírus HSV-1 foi utilizada a linhagem celular VERO cepa KOS, a qual é resistente ao aciclovir. Assim, o extrato bruto do isolado B506 (*Saccharopolyspora* sp.) pode ser considerado um extrato promissor para estudos na elucidação do composto ativo contra esse vírus diferente daquele disponível comercialmente. Por outro lado, o extrato bruto do isolado B141 apresentou atividade contra o vírus HBV-1 e não contra o HSV-1, o que pode sugerir que este extrato possui um mecanismo de ação parecido ao do aciclovir.

Os extratos brutos dos isolados B204 (*Gordonia*) e B729 (*Mycobacterium*) apresentaram atividade antiviral contra o vírus BVDV (Vírus da diarreia viral bovina), e extrato bruto do isolado B452 (*Williamsia*) contra o vírus FCV (Calicivírus Felino). Os extratos dos isolados B374, B175, B204, B240, B248, B367, B373, B276, B411 foram testadas para o hRSV (metapneumovirus humano) e não apresentaram atividade antiviral.

O vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus* – BVDV) é um vírus associado com a doença severa das mucosas em bovinos. Possui distribuição mundial e a infecção tem ampla distribuição no território brasileiro com uma grande diversidade de manifestações clínicas, que levam a perdas significativas no rebanho bovino. (RIDHPATH; FLORES, 2007). O BVDV possui uma organização estrutural semelhante ao vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus* – HCV), é de fácil cultivo *in vitro* e os clones moleculares estão disponíveis para estudos genéticos (BUCKWOLD *et al*, 2003). Ambos partilham um elevado grau de homologia em termos de organização genômica, estratégias de expressão de proteínas e replicação (GRASSMANN *et al.*, 2005). O BVDV é considerado, portanto, um modelo eficaz para a avaliação de drogas mostra-se com

atividade antiviral potencial contra o HCV e em estudos de mecanismos de ação (BASTOS et al., 2013; BUCKWOLD et al., 2003; YANAGIDA et al., 2004).

Acredita-se que a infecção pelo HCV seja a principal causa de hepatite humana no mundo (LI et al., 2012), o que representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, pois pacientes com infecção crônica por HCV apresentam alto risco de desenvolver cirrose hepática e até mesmo carcinoma hepatocelular (STRADER et al., 2004). Diante da ausência de vacina disponível e de um tratamento realmente eficaz, faz-se necessário buscar novos compostos que apresentem ação antiviral e que possam representar alternativas ao tratamento já existente.

Dentre os isolados que apresentaram potencial atividade antiviral, a maioria pertence ao gênero *Micrococcus* (nove isolados), seguido de dois isolados do gênero *Kocuria*, dois do gênero *Janibacter*, e um representante de cada gênero *Marmoricola*, *Kineococcus*, *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Saccharopolyspora*, *Mycobacterium*, *Nocardioide* e *Curtobacterium*. Também podemos observar diferentes atividades antivirais para os isolados do gênero *Micrococcus*, apresentando atividades contra os vírus BVDV (B232, B162 e B470), FC (B150, B612, B682 e B512) e HBV1 (B168, B277 e B266). Ainda, os isolados de *Micrococcus* que apresentaram atividade antimicrobiana foram distintos dos isolados que apresentaram atividade antiviral, apenas quatro isolados de *Micrococcus* sp. apresentaram atividade antimicrobiana e antiviral (B150, B232, B612 e B682), sugerindo que os compostos responsáveis pelas atividades biológicas são distintos. Outro resultado considerado relevante neste estudo foi a atividade antiviral contra os vírus FC (B135) e HBV1 (B141), para o gênero *Kocuria* nunca antes reportado.

Em relação à atividade antiviral, descrita na tabela 9, os isolados B374 e B366, já confirmados como novas espécies, e os isolados B138, B204, B452 e RI06, considerados novas espécies, apresentaram atividade antiviral.

Os isolados B138 e B366 apresentaram ambas as atividades avaliadas. Interessantes resultados observados para os isolados do gênero *Williamsia*, todos isolados apresentaram alguma potencial atividade. Assim como para o gênero *Janibacter*, os dois isolados apresentaram atividade antiviral.

3.3.3. MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os extratos considerados ativos foram submetidos a estudo de mecanismo de ação. Foram avaliados o mecanismo de ação para os extratos ativos para os vírus HSV-1

(B506, B255 e B141) e aMPV (B374). Foram identificados apenas a fase da replicação viral inibida para o isolado B374 para o vírus aMPV (Tabela 10).

Tabela 10. Identificação de qual fase da replicação viral do vírus aMPV inibida pelos extratos dos isolados de actinomicetes, frente a diferentes tipos de tratamento.

aMPV						
Amostra	E+V		V+E		VE	
B374 <i>Marmoricola</i> sp.	$10^{2,5}/0$	$10^{2,5}/90$	$10^{2,75}/44$	$10^{3,25}/0$	$10^{3,5}/90$	$10^{4,0}/44$
CT	$10^{2,5}$	$10^{3,5}$	$10^{3,5}$	$10^{3,5}$	$10^{4,5}$	$10^{4,5}$

De acordo com a Tabela 10, o extrato B374 pode interferir na fase de adsorção, podendo interagir no receptor celular impedindo a ligação deste ao vírus ou o extrato atua sobre o vírus impedindo sua ligação com o receptor celular. Ao impedir a adsorção ou a penetração do vírus, o extrato foi capaz de impedir todo o ciclo replicativo do vírus, já que tratam-se de etapas iniciais, sem as quais a partícula viral não é capaz de replicar-se no interior da célula e produzir novas partículas virais. Isso garante a eficácia de um tratamento, já que para infectar novas células, partículas virais são continuamente liberadas após a infecção. As substâncias ativas do extrato B374, portanto, foram capazes de intervir, in vitro, na progressão da infecção do vírus aMPV.

Doenças causadas, em humanos e animais, por patógenos virais, tem enorme impacto econômico e mostra a necessidade de descoberta novas drogas, devido ao aumento de resistência dos vírus aos tratamentos disponíveis, bem como o surgimento de novos vírus, assim como a existência de poucas opções terapêuticas para o tratamento. A descoberta de novas drogas bem como a adaptação das existentes, tem papel chave contra a resistência viral a drogas. Centenas de novos compostos foram isolados de vários organismos marinhos e testados para propriedades farmacológicas, alguns destes já estão comercialmente disponíveis, tais como aciclovir, vidarabina, citarabina e zidovudina. Entretanto, poucos foram obtidos a partir de bactérias de ambiente marinho, entre eles apenas EPS-1 e EPS-2, isolados de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus thermodenitrificans*, respectivamente, e Macrolactina A, isolado de bactéria de mar profundo. Por outro lado, existem vários compostos isolados de algas e esponjas marinhas, com atividade antiviral contra vírus da AIDS, HSV, herpes vírus (YASUHARA-BELL; LUB, 2010).

Micro-organismos marinhos são grandes produtores de compostos bioativos com atividades farmacológicas, inclusive anti-viral, e podem fornecer recursos ilimitados para a descoberta e produção de drogas terapêuticas para o tratamento e controle de doenças virais em humanos, animais e espécies agrícolas marinhas, bem como compostos com outras funções, tais como suplementos nutricionais, cosméticos, agroquímicos, enzimas, produtos com potencial valor de mercado (BHADURY et al., 2006). Demain e Vaishnav (2011) reforçam a ideia de Bhatnagar e Kim (2010) , de que alguns metabólitos secundários bioativos de origem microbiana com fortes atividades antimicrobiana e anti-fúngica, utilizados como antibióticos e podem ser efetivos contra doenças infecciosas, tais como HIV, e condições de infecções por múltiplas bactérias (tais como penicilina, cefalosporina, estreptomicina e vancomicina).

Os actinomicetos avaliados nesse estudo apresentaram distintas atividades antimicrobianas e antivirais. Extratos com potencial para descoberta de novas moléculas ou associações de compostos, com potencial biotecnológico.

3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmohsen, U.R.; Pimentel-Elardo, S.M.; Hanora, A.; Radwan, M.; Abou-El-Ela, S.H.; Ahmed, S.; Hentschel, U. (2010) Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Mar Drugs*, 8: 399-412.
- Arns, C.W. E Hafez, H.M. Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: Proceedings of the 44th Western Poultry Diseases Conference, Sacramento, California, USA, 1995, p. 124-125.
- Ballantine, D.L.; Gerwick, W.H.; Velez, S.M.; Alexander, E.; Guevara, P. (1987) Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, 151/152: 463-469.
- Ballestrero, F.; Thomas, T.; Burke, C.; Egan, S.; Kjelleberg, S. (2010) Identification of Compounds with Bioactivity against the Nematode *Caenorhabditis elegans* by a Screen Based on the Functional Genomics of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2. *Appl. Environ. Microbiol*, 76(17): 5710.
- Bastos, J.C.S.; Kohn, L. K.; Fantinatti-Garboggini, F.; Padilla, M. A.; Flores, E.F.; da Silva, B.P.; Menezes, C.B.A.; Arns, C.W. (2013) Antiviral Activity of *Bacillus* sp. Isolated from the Marine Sponge *Petrovaca* against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. *Viruses*, (5): 1219-1230.
- Bewley, C. A., Holland, N. D., Faulkner, D. J. (1996) Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 52: 716-722.
- Berdy J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65: 385-395.

- Bhadury P, Mohammad BT, Wright PC: (2006) The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006, 33: 325-337.
- Bhatnagar, I.; Kim, S.K. Immense Essence of Excellence: (2010) Marine Microbial Bioactive Compounds. *Mar. Drugs*, 8: 2673-2701.
- Burn, P. (1988) Amphitrophic proteins: A new class of membrane proteins. *Trends biochem. Sci*, 13: 79-83.
- Buckwold, V.E.; Beer, B.E.; Donis, R.O. (2003a) Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral research*, 60: 1-15.
- Buckwold, V.E.; Wei, J.; Wenzel-Mathers, M.; Russell, J. (2003b). Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and ribavirin against bovine viral diarrhea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47: 2293-2298.
- Bull, A. T. & Stach, J. E. M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol* 15, 491-499
- Chelossi, E.; Milanese, M.; Milanoc, A.; Pronzatob, R.; Riccardi, G. (2004) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309: 21– 33.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada – 2ª. Edição, Norma M27-A2, 2002, vol.22, nº. 15.
- CLSI. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Clinical and Laboratorial Standards Institute, 6a. ed, CLSI Norma M7-A6, 2003, vol. 23 nº. 2.
- Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V. E.; Maes, L. (2006) Antiinfective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3): 290-302.
- Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.A. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. *Quim. Nova*. 32(3): 703-716.
- D'Arce, R.C.F.; Coswig L.T.; Almeida, R.S; Trevisol, I.M.; Monteiro, M.C.B.; Lorenz, R.J. E Bögel, K. (1973) Methods of calculation In *Laboratory Techniques in Rabies*. Kaplan MM and Koprowsky H (eds) . World Health Organization. Geneva, 321-355.
- Dani MA, Durigon EL, Arns CW. (1999) Molecular characterization of Brazilian Avian Metapneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of Virological Methods*, 79: 237-241.
- Demain, A.L.; Vaishnav, P. (2011) Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6): 687–699.
- Eltamany, E.E., Abdelmohsen, U.R., Ibrahim, A.K., Hassanean, H.A., Hentschel, U., Ahmed, S.A. (2014) New antibacterial xanthone from the marine sponge-derived *Micrococcus* sp. EG45. *Bioorg Med Chem Lett*, 24(21):4939-4942.
- Gerwick, W.H.; Fenical, W.; Norris, J.N. (1985) Chemical variation in the tropical seaweed *Styopodium zonale* (Dictyotaceae). *Phytochemistry*, 24: 1279–1283.
- Goodfellow, M., Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 119-142

- Grassmann, C.W.; Yu, H.; Isken, O.; Behrens, S-E. 2005. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhoea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: Implications for the viral life cycle. *Virology*. 333: 349-366.
- Imhoff, J.F., Stöhr, R. (2003) Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. *Prog Mol Subcell Biol*, 37:35-57.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J., Fenical, W. (2005a) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*, 7:1039-1048.
- Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. (2005b) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 43-48.
- Jiang S, Sun W, Chen M, Dai S, Zhang L, Liu Y, Lee KJ, Li X. (2007) Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92: 405–416.
- Jin, Z. H., Lin, J. P., Xu, Z. N. & Cen, P. L. (2002). Improvement of industry-applied rifamycin B-producing strain, *Amycolatopsis mediterranei*, by rational screening. *J Gen Appl Microbiol* 48: 329-334.
- Jung, H. M., Jeya, M., Kim, S. Y., Moon, H. J., Kumar Singh, R., Zhang, Y. W., Lee, J. K. (2009). Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 417-428.
- König, G.M.; Wright, A.D.; Sticher, O.; Angerhofer, C.K.; Pezzuto, J.M. (1994) Biological Activities of Selected Marine Natural Products. *Planta Med*, 60: 532-537
- Kumar, S.S., Philip, R., Achuthankutty, C. (2006) Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Curr Sci*, 91(6):807–811.
- Kurahashi M, Fukunaga Y, Sakiyama Y, Harayama S, Yokota A. (2010) *Euzebya tangerina* gen. nov., sp. nov., a deeply branching marine actinobacterium isolated from the sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Euzebyaceae* fam. nov., *Euzebyales* ord. nov. and *Nitriliruptoridae* subclassis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 2314–2319.
- Madin S.H., York C.J. & McKercher D.G. (1956) Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 124: 721-722.
- Li, Z.; Liu, Y. (2006) Marine sponge *Craniella australiensis* associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *Lett Appl Microbiol*, 43: 410–416.
- Li, Y., Zhang, Q., Liu, Y., Luo, Z., Kang, L., Qu, J., Liu, W., Xia, X., Liu, Y., Wu, K., Wu, J. (2012) Hepatitis C virus activates Bcl-2 and MMP-2 expression through multiple cellular signaling pathways. *J Virol*, 86(23):12531-12543.
- Lorenz, R.J., Bögel, K. Methods of calculation. In: Kaplan, M.M., Koprowsky, H. (Eds.) *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization. 1973. p. 329-332.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.-K. (2014a) Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol. Res.* 169 (26), 262–278.
- Manivasagana, P., Kanga, K-H., Sivakumarb, K., Eunice, C.Y., Li-Chanc, Oha, H-M., Kima, S-K. (2014b) Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. *Environ Toxicol Pharmacol*, 3 8: 172–188.

- Montalvo, N.F.; Mohamed, N.M.; Enticknap, J.J.; Hill, R.T. (2005) Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:29–36
- Müller, W.E.G.; Brümmer, F.; Batel, R.; Müller, I.M.; Schröder, H.C. (2003) Molecular biodiversity. Case study: Porifera (sponges) *Naturwissenschaften*, 90: 103–120.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 70:461–477.
- Newman, D.J.; Shapiro, S. (2008) Microbial prescreens for anticancer activity. *SIM News*, 58: 132–150.
- Nurul, Z.A.; Darah, I.; Shaida, S.F.; Nor, S.A. Screening for Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Acanthophora spicifera*(Rhodomelaceae, Ceramiales) from Malaysian Waters. *Research Journal of Biological Sciences*, 2010, 5 (5): 368-375.
- Okami, Y.; Hotta, K. Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M (ed). *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, New York, 1988, pp 33–67.
- Oliynyk, M., Samborsky, M., Lester, J. B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S. F. & Leadlay, P. F. (2007). Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 23338. *Nat Biotechnol* 25: 447-453.
- Osinga, R., Kleijn, R., Groenendijk, E., Niesink, P., Tramper, J., Wijffels, R.H. (2001) Development of in vivo sponge cultures: particle feeding by the tropical sponge *Pseudosuberites aff. andrewsi*. *Mar Biotechnol* (NY), 3(6):544-554.
- Newman DJ, Cragg GM. (2012) Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75: 311–335.
- Park, H.B.B.; Kwon, H.C.; Lee, C.H.; Yang, H.O. (2009) Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *J Nat Prod*, 72: 248–252.
- Pickens, L.B.; Kim, W.; Wang, P.; Zhou, H.; Watanabe, K.; Gomi, S.; and Tay, Y. (2009) Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *J Am Chem Soc*, 131: 17677–17689.
- Pimentel-Elardo, S.M. Novel Anti-infective secondary metabolites and biosynthetic gene clusters from actinomycetes associated with marine sponges. Dissertation thesis, University of Würzburg Würzburg, Germany, 2008.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebel, R. (2002) Drugs from the seas—current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 125–134.
- Ravikumar, Y.S.; Upasana Ray; Nandhitha, M.; Perween, A.; Naika, H.R. (2011) Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthusamarus* as a potent natural source. *Virus research*. 158: 89-97.
- Ridhpath, J.F.; Flores, E.F. Flaviviridae. In: Eduardo Furtado Flores (org). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p.565-591.
- Sipkema, D.; Franssen, M.C.R.; Osinga, R.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. (2005) Marine Sponges as Pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7: 142–162.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R.. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (13): 1107-1112.
- Smee DF, Morrison AC, Barnard DL, Sidwell RW. (2002) Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J Virol Methods*.106(1): 71-79.

- Strader, D.B.; Wright, T.; Thomas, D.L.; Seeff, L.B. (2004) Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 39: 1147-1171.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71 :295–347.
- Thakur, N.L., Müller, W.E.G. (2004) Biotechnological potential of marine sponges. *Curr. Sci.*, 86: 1506–1512.
- Vaishnav, P.; Demain, A.L. (2010) Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29: 223–229.
- Wagman, G. H. & Weinstein, M. J. (1980). Antibiotics from *Micromonospora*. *Annu Rev Microbiol* 34: 537-557.
- Webster, N.S.; Wilson, K.J.; Blackall, L.L.; Hill, R.T. (2001) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol*, 67: 434–444.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M., Wagman, G. H., Rosselet, J. P., Marquez, J. A., Coniglio, C. T., Charney, W., Herzog, H. L. & Black, J. (1963) Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora* [2]. *J Med Chem* 6: 463-464.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol*176: 386–390.
- Wink, J. M., Kroppenstedt, R. M., Ganguli, B. N., Nadkarni, S. R., Schumann, P., Seibert, G. & Stackebrandt, E. (2003). Three new antibiotic producing species of the genus *Amycolatopsis*, *Amycolatopsis balhimycina* sp. nov., *A. tolypomycina* sp. nov., *A. vancoresmycina* sp. nov., and description of *Amycolatopsis keratiniphila* subsp. *keratiniphila* subsp. nov. and *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* subsp. nov. *Syst Appl Microbiol* 26: 38-46.
- Yanagida, K.; Baba, C.; Baba, M. (2004) Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon- α . *Antiviral research*. 64: 195-201.
- Yasuhara-Bell, J.; Lub, Y. (2010) Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86: 231–240.
- Zheng, Z.; Zeng, W.; Huang, Y.; Yang, Z.; Li, J.; Cai, H.; Su, W. (2000) Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett*, 188: 87–91.

4. DISCUSSÃO GERAL

Diversos organismos marinhos produzem metabólitos bioativos em resposta a pressões ecológicas tais como competição por espaço, manutenção de superfícies limpas, dissuasão de predação e capacidade de reprodução (KONIG et al., 1994; THAKUR et al., 2004). Esponjas marinhas são importante fonte para desenvolvimento de drogas (SIPKEMA et al., 2005), com evidências de que os micro-organismos simbiotes são os produtores de metabólitos biologicamente ativos, assim os micro-organismos associados a macro-organismos são importante fonte para a busca de potenciais compostos ativos com funções biológicas (IMHOFF E STOHR 2003; OSINGA et al., 2001) e aplicações biomédicas, farmacêuticas e biotecnológicas (PROKSCH et al., 2002; TAYLOR et al., 2007).

No presente estudo, dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, sete foram obtidos de esponjas marinhas, quatro de algas, um de ascídia e quatro a partir da amostra de água do mar. Enquanto que para os isolados que apresentaram atividade antiviral, quatro foram obtidos de algas marinhas, doze de esponjas marinhas, três de ascídia, e três de amostra de água do mar. Os isolados B204, B168 e B232 oriundos da mesma amostra de ascídia *Didemnum* sp., e B374, B367, B422 e B452 da esponja *Glodia corticostylifera*. Os três isolados (B137, B138 e B506) oriundos da esponja *Amphimedon viridis*, apresentaram atividades antiviral e antimicrobiana. Uma esponja hospedeira pode possuir diversos simbiotes. A esponja *Theonella swinhoei*, por exemplo, abriga bactérias heterotróficas unicelulares, cianobactérias unicelulares e bactérias filamentosas heterotróficas simultaneamente (BEWLEY et al., 1996). Por outro lado, existem evidências de que alguns micro-organismos simbióticos podem habitar esponjas específicas. A presença de micro-organismos com atividade antimicrobiana ou antiviral, sugere que a microbiota pode atuar como linha de defesa do macro-organismo contra patógenos (TAYLOR et al., 2007).

Houve amplo espectro de atividades, antimicrobiana e antiviral, por isolados do gênero *Micrococcus*. Do total de 28 *Micrococcus* isolados dos macro-organismos marinhos, doze apresentaram atividade antiviral e/ou antimicrobiana. O gênero é composto por muitas espécies, e nossos isolados, não definidos a nível de espécies, podem pertencer a várias espécies diferentes, por isso essa diversidade de atividades.

Os isolados B138 e B366 apresentaram ambas as atividades avaliadas. E resultados observados para os isolados do gênero *Williamsia*, todos isolados (B138, B375 e B452),

possíveis novas espécies, apresentaram potencial atividade antimicrobiana e / ou antiviral. Assim como para o gênero *Janibacter*, os dois isolados (B255 e B742) apresentaram atividade antiviral.

O isolado B506 (*Saccharopolyspora* sp.) apresentou atividade contra o vírus HSV-1, e ainda apresentou atividade antimicrobiana contra *B.subtilis*. Assim como os isolados B150 e B612 (FCV e *B.subtilis*), isolado B232 (BVDV, *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*) e isolado B682 (FCV e *S. aureus*).

Extratos que apresentaram atividades antimicrobiana (B138, B175, B366 e B375) e/ou antiviral (B138, B204, B366, B374, B452, B742), obtidos dos isolados descritos como espécies novas, podem fornecer novos metabólitos responsáveis pelas atividades, sendo, portanto promissores para futuros estudos na identificação dos compostos. Apenas o isolado B736 não apresentou qualquer atividade avaliada, enquanto os isolados B138 e B366 apresentaram ambas as atividades. Destacam-se também os isolados **B175**, **B204**, **B366** e **B375**, que pertencem a novas espécies, em processo de descrição, conforme sugerido pela análise do gene RNA ribossomal 16S, MLSA e análises quimiotaxonômicas (Figuras 3 a 12), e confirmados pela hibridação DNA-DNA. E o isolado **B138** pode pertencer a nova espécie conforme sugerido pela análise do gene RNA ribossomal 16S e do MLSA. Esses isolados podem ser fontes de novos metabólitos secundários.

A exploração do ambiente marinho representa uma estratégia promissora na busca por componentes ativos contra as doenças infecciosas (YASUHARA-BELL et al., 2010). Além de suas estruturas peculiares, produtos naturais marinhos possuem uma extraordinária diversidade de alvos moleculares com seletividade marcante, como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico, o que potencializa o efeito farmacológico e terapêutico dessas moléculas (COSTA-LOTUFO et al., 2009). A taxa de descoberta de novos compostos é realmente muito maior em espécies novas, taxonomicamente, do que em espécies conhecidas (PIMENTEL-ELARDO, 2008). Vários trabalhos mostram que quanto mais espécies novas isoladas de diversos ambientes, maior a capacidade de oferecer fontes de novos metabólitos bioativos (BREDHOLDT et al., 2008; BULL et al., 2005; BULL; STACH, 2007; LEE et al., 2014).

5. CONCLUSÕES

- Análise do gene RNA ribossomal classificou todos os isolados nos respectivos gêneros e indicou a existência de nove novas espécies para os gêneros *Gordonia*, *Janibacter*, *Kineococcus*, *Knoellia*, *Marmoricola*, *Serinicoccus* e *Williamsia*.
- Análise de MLSA dos genes *rpoA*, *gyrB*, *rpoB*, *trpB* e *recA*, isolados e concatenados, corroboraram com a análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S.
- A hibridação DNA-DNA, dos isolados com as espécies tipos com mais de 99% de similaridade de sequência do gene rRNA 16S, confirmou os dados de rRNA 16S e MLSA, os isolados B175, B204 e B375 são espécies novas, distintas das espécies tipos descritas.
- Os isolados, os quais não há a necessidade da realização da hibridação DNA-DNA, foram caracterizados apenas pelas análises moleculares (gene rRNA 16S e MLSA) e pelos testes quimiotaxonômicos.
- A espécie *Marmoricola aquaticus* B374^T foi descrita como nova espécie e outras oito espécies apresentaram resultados distintos das espécies já descritas e são possíveis novas espécies.
- Os extratos obtidos diretamente das células das linhagens dos isolados de actinomicetos apresentaram diferentes atividades antimicrobianas contra as bactérias patogênicas em testes *in vitro*, e amplo espectro de atividade antiviral contra diferentes tipos de vírus em teste *in vitro*.
- Extratos que apresentaram atividades antimicrobiana (B138, B175, B366 e B375) e/ou antiviral (B204, B366, B374, B452, B742), obtidos dos isolados descritos como espécies novas, podem fornecer novos metabólitos responsáveis pelas atividades, sendo, portanto promissores para futuros estudos na identificação dos compostos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho disponibilizou centenas de isolados de bactérias que foram preservados na CBMAI. Vários destes isolados não foram identificados em nível de espécie e, possivelmente, muitos deles podem ser espécies novas que merecem ser descritas.

A partir deste estudo foi possível conhecer a diversidade microbiana associada a macroorganismos marinhos abrindo possibilidades para implementação de novas estratégias de isolamento visando grupos específicos de micro-organismos.

A caracterização química dos extratos que apresentaram atividades biológicas, visando a identificação dos compostos responsáveis por essas atividades são etapas subsequentes que podem ser estudadas. Ainda, estes extratos podem ser avaliados quanto diferentes ensaios clínicos na busca de novas moléculas promissoras para tratamento de inúmeras doenças.

7. APÊNDICES

Apêndice I

Material suplementar do capítulo 2

***Marmoricola aquaticus* sp. nov. an actinomycete isolated from marine sponge**

Claudia Beatriz Afonso de Menezes; Mariana Ferreira Tonin; Leonardo José Silva; Wallace Rafael de Souza; Márcia Parma; Itamar Soares de Melo; Tiago Domingues Zucchi; Suzete Aparecida Lanza Destefano; Fabiana Fantinatti-Garboggini.

Artigo aceito pela revista International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
Marmoricola aquaticus sp. nov. an actinomycete isolated from marine sponge.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IJS-D-14-00501R1
Full Title:	Marmoricola aquaticus sp. nov. an actinomycete isolated from marine sponge.
Short Title:	Marmoricola aquaticus sp. nov. an actinomycete isolated from marine sponge.
Article Type:	Standard
Section/Category:	New taxa - Actinobacteria
Corresponding Author:	Fabiana Fantinatti Garboggini University of Campinas Paulínia, São Paulo BRAZIL
First Author:	Claudia Beatriz Afonso de Menezes
Order of Authors:	Claudia Beatriz Afonso de Menezes Mariana Ferreira-Tonin Leonardo José Silva Wallace Rafael de Souza Márcia Parma Itamar Soares de Melo Tiago Domingues Zucchi Suzete Aparecida Lanza Destefano Fabiana Fantinatti Garboggini
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	A novel marine actinomycete, designated isolate B374T, was isolated from marine sponge <i>Glodia corticostylifera</i> , collected from São Paulo, Brasil, and its taxonomic position was established by using data from a polyphasic approach. The organism showed a combination of chemotaxonomic and morphological characteristics consistent with its classification in the genus <i>Marmoricola</i> and formed a distinct phyletic line in the clade of the genus <i>Marmoricola</i> based on the 16S rRNA gene sequences. Strain B374T was most closely related to <i>Marmoricola aequoreus</i> SST-45T (98.5 % 16S rRNA gene sequence similarity) but was distinguished from this strain and from the other type strains of <i>Marmoricola</i> species based on a combination of phenotypic properties. Based on the data obtained, the isolate B374T (=CBMAI 1089T =DSM 28169T) should therefore be classified as the type strain of a novel species of the genus <i>Marmoricola</i> , for which the name <i>Marmoricola aquaticus</i> sp. nov. is proposed.

1 ***Marmoricola aquaticus* sp. nov. an actinomycete isolated from marine**
2 **sponge.**

3 Claudia Beatriz Afonso de Menezes^{1,2}; Mariana Ferreira Tonin³; Leonardo José
4 Silva⁴; Wallace Rafael de Souza⁴; Márcia Parma⁴; Itamar Soares de Melo⁴;
5 Tiago Domingues Zucchi^{4, 5}; Suzete Aparecida Lanza Destefano³; Fabiana
6 Fantinatti-Garboggini^{1,2}.

7

8 ¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas,
9 UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

10 ² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP,
11 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

12 ³ Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Centro
13 Experimental do Instituto Biológico Lab. de Bacteriologia Vegetal.

14 ⁴ Embrapa Meio Ambiente, 13820-00 Jaguariúna, SP, Brazil.

15 ⁵ Agrivalle, 37550-000 Pouso Alegre, MG, Brazil.

16

17 **Author for correspondence:** Dr. Fabiana Fantinatti-Garboggini, Centro
18 Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas, UNICAMP,
19 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone (+55) 19 21392893, email:
20 fabianaf@cpqba.unicamp.br

21

22 Running title: *Marmoricola aquaticus* sp. nov.

23 New taxa - Actinobacteria

24 The GenBank accession number for the 16S rRNA sequence of *Marmoricola*
25 *aquaticus* CBMAI 1089^T (= DSM 28169^T) is JN615437.

26 **Abstract**

27 A novel marine actinomycete, designated isolate B374^T, was isolated from
28 marine sponge *Glodia corticostylifera*, collected from São Paulo, Brasil, and its
29 taxonomic position was established by using data from a polyphasic approach.
30 The organism showed a combination of chemotaxonomic and morphological
31 characteristics consistent with its classification in the genus *Marmoricola* and
32 formed a distinct phyletic line in the clade of the genus *Marmoricola* based on
33 the 16S rRNA gene sequences. Strain B374^T was most closely related to
34 *Marmoricola aequoreus* SST-45^T (98.5 % 16S rRNA gene sequence similarity)
35 but was distinguished from this strain and from the other type strains of
36 *Marmoricola* species based on a combination of phenotypic properties. Based
37 on the data obtained, the isolate B374^T (=CBMAI 1089^T =DSM 28169^T) should
38 therefore be classified in a novel species of the genus *Marmoricola*, for which
39 the name *Marmoricola aquaticus* sp. nov. is proposed.

40

41 **Keywords:** *Marmoricola aquaticus*; Polyphasic taxonomy; São Paulo state;
42 marine sponge.

43

44 **Introduction**

45 The genus *Marmoricola* was proposed by Urzì *et al.* (2000) to accommodate a
46 new member of the family *Nocardioideae*, namely *Marmoricola aurantiacus*,
47 which possessing unique morphological, physiological and chemotaxonomic
48 characteristics. At the time of writing other four species, *Marmoricola aequoreus*
49 Lee (2007), *Marmoricola bigeumensis* Dastager *et al.* (2008), *Marmoricola*
50 *scoriae* Lee & Lee (2010) and *Marmoricola korecus* Lee *et al.* (2011) have been
51 described. These organisms form a phylogenetically coherent cluster within the
52 family *Nocardioideae* and are well separated from other genera of the family
53 by a combination of chemotaxonomic and physiological features (Lee *et al.*,
54 2011, Lee & Lee, 2010). Members of the genus are rare and still randomly
55 isolated but they have been found in diverse environments, such as marble,
56 beach sediment, agricultural soil and volcanic ash (Lee, 2007; Dastager *et al.*,
57 2008; Lee & Lee, 2010; Lee *et al.*, 2011). The present study was designed to
58 establish the taxonomic position of isolate B374^T, isolated from *Glodia*
59 *corticostylifera*, a marine sponge collected in São Paulo, Brazil, using a
60 polyphasic approach. The resultant data showed that the isolate forms a new
61 centre of taxonomic variation in the genus *Marmoricola* and therefore, it is
62 proposed that the isolate be recognized as a new *Marmoricola* species, namely
63 *Marmoricola aquaticus* sp. nov..

64 Treatment of the sample and preparation of media for bacterial isolation were
65 performed as described by Menezes *et al.*, (2010). Isolate B374^T was recovered
66 from M1 agar plate (soluble starch 10 g l⁻¹, yeast extract 4 g l⁻¹, peptone 2 g l⁻¹,
67 1, agar 15 g l⁻¹, 80 % artificial seawater) which had been inoculated with a
68 suspension of triturated *G. corticostylifera* and incubated at 25°C for 1-4 weeks.

69 The organism was maintained on M1 agar plate at 4°C and as cell suspension
70 in glycerol (20% v/v) at -80°C. Biomass for the chemotaxonomic and molecular
71 systematic studies was grown in shake flasks of ISP 2 broth (International
72 Streptomyces Project medium 2; Shirling & Gottlieb, 1966) for 7 days at 30°C,
73 harvested by centrifugation and washed twice in distilled water. Biomass for the
74 fatty acid analysis on the isolate and type strains of *Marmoricola* were
75 harvested from Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) which had been incubated at
76 30°C for three days.

77 The phylogenetic position of strain B374^T was determined by 16S rRNA gene
78 sequence analysis. Genomic DNA was extracted according to modified Van
79 Soolinger *et al.* (1993) and PCR amplification and 16S rRNA gene sequencing
80 were achieved using procedures described previously (Menezes *et al.*, 2010),
81 using the primer 1525r (5' AAGGAGGTGWTCCARCC 3'; Lane, 1991), instead
82 of primer 1401r. The almost complete 16S rRNA gene sequence (1428
83 nucleotides [nt]) of strain B374^T was aligned using MEGA version 6 software
84 (Tamura *et al.*, 2013) against corresponding sequences of closely related type
85 strains of *Marmoricola* species retrieved from the GenBank database using the
86 EzTaxon-e server (Kim *et al.*, 2012). Phylogenetic trees were inferred by using
87 the maximum-likelihood (Felsenstein, 1981), maximum-parsimony (Fitch, 1971)
88 and neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) tree-making algorithms drawn from
89 the MEGA 6 package (Tamura *et al.*, 2013); an evolutionary distance matrix for
90 the neighbour-joining analysis was generated using the Jukes & Cantor (1969)
91 model. The appropriate nucleotide substitutions for the maximum-likelihood
92 analysis were selected by the Bayesian Information Criterion (BIC) using the
93 MEGA 6 software and found to follow the Tamura-Nei parameter (TN93+G+I)

94 model (Tamura & Nei, 1993). The topologies of the evolutionary trees were
95 evaluated by a bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) of the neighbour-joining
96 method based on a 1,000 replicates using the MEGA 6 software. The root
97 position of the neighbour-joining tree was inferred by using *Kribbella antibiotica*
98 YIM 31530^T (GenBank accession no. AY082063) as outgroup. The DNA G + C
99 content (mol %) of isolate B374^T was estimated using the thermal denaturation
100 method, as described by Gonzalez & Saiz-Jimenez (2002).

101 It can be seen from Fig. 1 that isolate B347^T was recovered in the clade of the
102 genus *Marmoricola* based on the 16S rRNA gene sequences, an association
103 which is also underpinned by maximum-parsimony tree-making algorithm. The
104 isolate formed a new phyletic line closely associated with the type strain of *M.*
105 *aequoreus* SST-45^T, a result that is supported by all tree-making algorithms and
106 by a 90% bootstrap value. Strain B374^T shared its highest 16S rRNA similarity
107 with the type strain of *M. aequoreus* SST-45^T, namely 98.5%, a value which
108 corresponded to 21 nt differences at 1,393 sites. The corresponding 16S rRNA
109 similarities with the other type strains assigned in the genus *Marmoricola* varied
110 from 96.3 to 97.8%.

111 DNA–DNA relatedness studies between isolate B374^T and its closest
112 phylogenetic neighbors were not carried out because the levels of 16S rRNA
113 gene sequence similarity between the strains were lower than those between
114 the other organisms assigned to the genus *Marmoricola*. Also, the 16S rRNA
115 similarity values were lower than the 99.0% cut-off point recommended for
116 mandatory DNA:DNA relatedness studies for *Actinobacteria* members (Meier-
117 Kolthoff *et al.*, 2013). The DNA G+C content of isolate B374^T was 74.3 mol%.

118

119 Standard procedures were used to determine the isomers of diaminopimelic
120 acid (Staneck & Roberts, 1974), the acyl type of murein (Uchida *et al.*, 1999),
121 and the menaquinone and polar lipids profiles (Minnikin *et al.*, 1984) of strain
122 B374^T, using *M. aequoreus* NRRL B-24464^T as control. The isolate was found
123 to contain LL-diaminopimelic acid as diagnostic diamino acid in the
124 peptidoglycan, N-acetylated muramic acid, and major amounts of
125 phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and
126 phosphatidylmethylethanolamine (Fig. S1). The predominant menaquinone was
127 MK-8(H4). These chemotaxonomic data are in line with the assignment of the
128 isolate to the genus *Marmoricola* (Urzi *et al.*, 2000).

129 Mycolic acids were sought from isolate B374^T using the acid methanolysis
130 procedure of Minnikin *et al.* (1980). Fatty acids extracted from the isolate were
131 methylated and analysed by using the standard Sherlock Microbial Identification
132 (MIDI) system, ACTINO version 5 (Sasser, 1990). Isolate B374^T was shown to
133 lack mycolic acids. The cellular fatty acid profile of the isolate was shown to
134 contain major proportions (>10%) of C_{16:0} (27.5%), C_{17:1} ω8c (15.6%) and C_{18:1}
135 ω9c (19.1%) (Table S1). All of these chemical properties are in line to support
136 the assignment of the isolate in the genus *Marmoricola* (Urzi *et al.*, 2000).

137 Morphological and physiological characteristics were investigated by using
138 Glucose-yeast extract agar (Gordon & Mihm, 1962) at 28 °C as the basal
139 medium, according Kim (2010). The type strain of *M. aequoreus* SST-45^T was
140 used as control. The temperature and pH ranges for growth were determined at
141 10, 28, 37 and 45 °C and at initial pH values of 4.0, 5.0, 9.0 and 10.0. NaCl
142 tolerance for growth was tested at 1, 3, 5 and 7 % (w/v) NaCl. Oxidase and
143 catalase activities, degradation ability and utilization of carbohydrates were

144 determined according to the methods described by Kim (2010). Other
145 physiological and biochemical properties were tested by using the API ZYM kits
146 (bioMérieux) according to the manufacturer's recommendations.

147 Cell morphology and motility were observed by using phase-contrast and
148 transmission electron microscopy, using cells from exponentially growing
149 cultures, after incubation on GY for 3 days at 30°C. For the latter, cells were
150 negatively stained with 2 % phosphotungstic acid, and after air drying, grids
151 were examined and observed with a model JEM-1200EX II (JEOL) transmission
152 electron microscope (modified Lee & Lee, 2010).

153 Cells of strain B374^T were aerobic, Gram-stain-positive, non-motile cocci (0.5-
154 0.7 µm in diameter) that were present singly, in pairs or in clusters. Strain B374^T
155 was negative for oxidase and urease tests. Catalase was produced. Nitrate was
156 not reduced to nitrite. Casein, gelatin, starch, cellulose and xylan were
157 hydrolysed. Xanthine, hypoxanthine was decomposed. Tween, 20, 60 and 80
158 were not hydrolysed, whereas Tween 40 was only weakly hydrolysed. Other
159 physiological and biochemical characteristics are given in Table 1 and in the
160 species description below. The isolate, unlike the others type strains of the
161 genus *Marmoricola*, degraded xanthine and was positive in tests for N-acetyl-b-
162 glucosaminidase and lipase (C14), and negative for esterase lipase (C8).
163 Nevertheless, all of the strains can be distinguished using a combination of
164 phenotypic features (Table 1). Isolate B374^T can be readily distinguished from
165 the type strain of *M. aequoreus* as it forms orange colonies; inability to grow at
166 pH 5.0 or in the presence of 5% NaCl; ability to degrade starch, hypoxanthine or
167 xanthine; inability to use D-fructose, glycerol, lactose, maltose, ribose and D-
168 sorbitol as sole carbon source.

169 It is also evident from all of the genotypic and phenotypic data that *Marmoricola*
170 strain B374^T can be distinguished readily from its phylogenetic neighbours. It is,
171 therefore, proposed that strain B374^T be recognized as a new *Marmoricola*
172 species, namely, *Marmoricola aquaticus* sp. nov.

173

174 **Description of *Marmoricola aquaticus* sp. nov.**

175 *Marmoricola aquaticus* (a.qua'ti.cus. L. masc. adj. *aquaticus* of or belonging to
176 marine environmental, referring to the source of the type strain).

177

178 Cells are aerobic, Gram-positive, non-sporulating, non-motile, spherical cells
179 that occurred singly, in pairs, in clusters or as short chains (0.5-0.7 µm).
180 Colonies are orange-coloured, smooth and regular. The optimum temperature
181 for growth is 28-30°C but it grows from 10 to 37°C. The pH ranged for growth
182 was 6.0 to 10.0. The organism hydrolysed Tween 40 and aesculin. Gelatin,
183 starch, xanthine, hypoxanthine, casein and cellulose are degraded. Nitrate is
184 not reduced to nitrite. Isolate produces alkaline phosphatase, trypsin,
185 achymotrypsin, α-glucosidase, β-glucosidase, β-galactosidase, lipase (C14) and
186 N-acetyl-β-glucosaminidase (API ZYM tests). Grows on D-galactose, L-
187 rhamnose and glycogen as sole carbon and energy sources, but not adonitol,
188 D-arabinose, cellobiose, D-fructose, glycerol, lactose, maltose, D-mannose,
189 meso-erythritol, raffinose, D-ribose, D-sorbitol, D-xylose, D-mannitol, uric acid,
190 malic acid, lactic acid, dextrin and oxalic acid. Additional phenotypic properties
191 are cited in the text or in Table 1. The predominant menaquinone was MK-
192 8(H4). The polar lipids comprised phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol,
193 diphosphatidylglycerol and phosphatidylmethylethanolamine. Mycolic acids are

194 absent. The diagnostic diamino acid in the cell walls was LL-diaminopimelic
195 acid and for muramic acid was N-acetylated. Glucose and ribose could be
196 detected only as whole-cell sugars. The DNA G+C content of type strain is 74.3
197 mol%.

198

199 The type strain is B374^T (=CBMAI 1089^T = DSM 28169^T) was isolated from
200 marine sponge *Glodia corticostylifera*, collected from Sao Paulo, Brazil. The
201 specie description is based on a single strain, which hence serves as the type
202 strain. The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene
203 sequence of strain CBMAI 1089^T is JN615437.

204

205 **Acknowledgements** This research was kindly supported by Fundação de
206 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants 2009/53320-7
207 and 2011/50243-1). The main author would like to thank FAPESP for a doctoral
208 scholarship (2009/13778-4). We thank Roberto Berlinck at the Universidade de
209 São Paulo, São Carlos, Brazil, by collection from marine macroorganisms.

210

211 **References**

- 212 Dastager, S. G., Lee, J. -C., Ju, Y. -J., Park, D. -J. & Kim, C. -J. (2008).
213 *Marmoricola bigeumensis* sp. nov., a member of the family *Nocardioideaceae*.
214 *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1060–1063.
- 215 Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum
216 likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.
- 217 Felsenstein, J. (1985), Confidence limits on phylogenies: an approach using the
218 bootstrap. *Evol* **39**, 783–791.
- 219 Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change
220 for specific tree topology. *Syst Biol* **20**, 406–416.

- 221 Gonzalez, J. M. & Saiz-Jimenez, C. (2002). A fluorimetric method for the
222 estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation
223 temperature. *Environ Microbiol* **4**, 770–773.
- 224 Gordon, R. E. & Mihm, J. M. (1962). The type species of the genus *Nocardia*. *J*
225 *Gen Microbiol* **27**, 1-10.
- 226 Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In
227 *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-123. Edited by Munro H. N., New
228 York: Academic Press.
- 229 Kim, B. Y., Stach, J. E. M., Weon, H. Y., Kwon, S. W. & Goodfellow, M. (2010).
230 *Dactylosporangium luridum* sp. nov., *Dactylosporangium luteum* sp. nov. and
231 *Dactylosporangium salmoneum* sp. nov., nom. rev., isolated from soil. *Int J*
232 *Syst Evol Microbiol* **60**, 1813–1823.
- 233 Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon,
234 Y. S., Lee, J. H. & other authors (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic
235 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent
236 uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.
- 237 Lane, D. J. (1991). 16S/23S sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in*
238 *Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M.
239 Goodfellow. Chichester: Wiley.
- 240 Lee, S. D. (2007). *Marmoricola aequoreus* sp. nov., a novel actinobacterium
241 isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1391–1395.
- 242 Lee, D. W. & Lee, S. D. (2010). *Marmoricola scoriae* sp. nov., isolated from
243 volcanic ash. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2135–2139.
- 244 Lee, S. D., Lee, D. W. & Ko, Y. –H. (2011). *Marmoricola korecus* sp. nov. *Int J*
245 *Syst Evol Microbiol* **61**, 1628–1631.
- 246 Meier-Kolthoff, J., Göker, M., Spröer, C. & Klenk, H. –P. (2013). When should a
247 DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol* **195**,
248 413–418.
- 249 Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z.,
250 Silva, C. H., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.
251 M. & other authors. (2010). Microbial diversity associated with algae,
252 ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil.
253 *Microbiol Res* **165**, 466-482.

254 Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B. & Goodfellow, M. (1980).
255 Thin-layer chromatography of methanolsates of mycolic acid-containing
256 bacteria. *J Chromatogr A* **188**, 221–233.

257 Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M.,
258 Schaal, A. & Parlett, J. H, (1984). An integrated procedure for the extraction
259 of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233–
260 241.

261 Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for
262 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 404–425.

263 Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular
264 fatty acids. *MIDI Technical Note 101*. Newark, DE: MIDI Inc.

265 Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of
266 *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313–340.

267 Stanek, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of
268 aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Environ Microbiol*
269 **28**, 226-231.

270 Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions
271 in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.
272 *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.

273 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6:
274 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 *Mol Biol Evol* **30**, 2725-
275 2729.

276 Uchida, K., Kudo, T., Suzuki, K. & Nakase, T. (1999). A new rapid method of
277 glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small
278 amount of bacterial cells of less than one milligram. *J Gen Appl Microbiol* **45**,
279 49-56.

280 Urzì, C., Salamone, P., Schumann, P. & Stackebrandt, E. (2000). *Marmoricola*
281 *aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family
282 *Nocardioideaceae* isolated from a marble statue. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**,
283 529–536.

284 Van Soolinger, D., De Haas, P. E. W., Hermans, P. W. M., Groenen, P. & Van
285 Embden, J. D. A. (1993). Comparison of various repetitive DNA elements as
286 genetics markers for strain differentiation and epidemiology of *M.*
287 *tuberculosis*. *J Clin Microbiology* **31**, 1987-1995.

289 **Table 1.** Differential characteristics between strain B374^T and the type strains of
 290 species of the genus *Marmoricola*.

291

292 Strains: 1. Isolate B374^T; 2. *M. korecus* Sco-A36^T (Lee *et al.*, 2011); 3. *M. aequoreus* SST-45^T
 293 (Lee, 2007); 4. *M. aurantiacus* DSM 12652^T (Urzi *et al.*, 2000); 5. *M. bigeumensis* KCTC
 294 19287^T (Dastager *et al.*, 2008); 6. *M. scoriae* Sco-D01^T (Lee & Lee, 2010). Comparative data
 295 were taken from Lee *et al.*, (2011) and this study. All of the strains were aerobic, Gram-positive,
 296 oxidase-negative, catalase-positive and positive for aesculin hydrolysis. All were positive for
 297 alkaline phosphatase, α -glucosidase and β -glucosidase, but negative for α -galactosidase, β -
 298 glucuronidase, α -mannosidase, α -fucosidase (API ZYM tests). +: positive; -: negative; w: weakly
 299 positive; ND: not determined.

300

Characteristics	1	2	3	4	5	6
Colony colour	Orange	Yellow	Yellow	Orange	Lemon yellow	Vivid yellow
Temperature range for growth (° C)	10-37	4–37	10–37	18–28	20–37	10–37
pH range for growth	6.0 - 10.0	5.1–12.1	5.1–12.1	5.1–8.7	6.0–12.0	6.1–12.1
NaCl concentration for growth (%)	0-3.0	0–2.0	0–7.0	0.5–2.0	0–7.0	0–3.0
Degradation of:						
Casein	+	+	+	-	-	+
Gelatin	+	+	+	-	-	+
Starch	+	-	-	-	+	-
Hypoxanthine	+	-	-	+	ND	-
Xanthine	+	-	-	-	+	-
Acid phosphatase	-	+	-	+	+	+
α -Chymotrypsin	+	-	-	-	+	-
Cystine arylamidase	-	w	w	-	+	w
Esterase (C4)	-	-	-	w	+	-
Naphthol-AS-Bi-phosphohydrolase	-	+	-	+	+	+
Trypsin	+	w	-	-	+	w
Valine arylamidase	-	+	+	w	-	+
Leucine arylamidase	-	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	-	+	w	+	+	+
Lipase (C14)	+	-	-	-	-	-
β -galactosidase	+	-	w	+	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	+	-	-	-	-	-
Utilization of:						
Adonitol	-	+	-	+	-	-
D-Arabinose	-	-	-	+	-	+

Cellulose	-	+	+	+	+	-
D-Fructose	-	-	+	+	-	+
D-Galactose	w	-	+	+	-	+
Glycerol	-	-	+	+	-	-
Lactose	-	-	+	+	+	-
Maltose	-	-	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	-	-
meso-Erythritol	-	+	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-	+
L-Rhamnose	w	-	-	+	+	+
L-Ribose	-	-	+	+	-	+
D-Sorbitol	-	-	+	+	+	-
D-Xylose	-	+	+	+	+	-
D-mannitol	-	+	+	+	-	+
D-Ribose	-	ND	-	+	+	ND
DNA G+C content (mol%)	74.3	71.0	72.4	72.0	72.9	72.0
Origin of isolation	Marine sponge	Volcanic ash	Beach sediment	Marble	Agricultural soil	Volcanic ash
Polar lipids*	PI, PG, DPG, PME	PI, DPG, PG, PC, PL	DPG, PG, PI, PL	DPG, PG, PI, PL	DPG, PG, PI, PL	DPG, PC, PG, PI, PL
Menaquinone	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-8(H4)	MK-8(H4)
Major fatty acids (>10%) **	C16 : 0, C17 : 0, C17 : 1&[omega]8c, C18 : 1&[omega]9c and Feature 3	C16 : 0, C17 : 1&[omega]8c, C18 : 1&[omega]9c, Feature 4	C16 : 0, C18 : 1&[omega]9c	C16 : 0, C18 : 1&[omega]9c	iso-C16 : 0, ,ai-C17 : 0, C16 : 0 and i-C14 : 0	C16 : 0, C18 : 1&[omega]9c, 10-methy C18:0 TBSA

301 *DPG: Diphosphatidylglycerol; PC: Phosphatidylcholine; PG: Phosphatidylglycerol; PI:
302 Phosphatidylinositol; PL: unknown phospholipid; PME: phosphatidylmethylethanolamine. **Summed fatty
303 acids that cannot be separated by GLC with the MIDI System. Feature 3 (16:1 ω 7c / 16:1 ω 6c - 16:1 ω 6c /
304 16:1 ω 7c), Feature 4 (C16:1 ω 7c and/or iso-C15:0 2-OH).
305

306 **Legend for the Figures**

307 **Figure 1.** Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene
308 sequences (1,428 nt) showing the relationships between strain B374^T and type
309 strains of phylogenetically closely related *Marmoricola* species. *White circles*
310 indicate branches of the tree that were also recovered with the maximum-
311 likelihood and maximum-parsimony tree-making algorithms; the *white diamonds*
312 and *black diamonds* stand for branches which were recovered using,
313 respectively, the maximum-likelihood and maximum-parsimony tree making
314 algorithms. *Numbers* at the nodes are percentage bootstrap values based on a
315 neighbor-joining analysis of 1,000 resampled datasets; only values above 50%
316 are shown. *Kribbella antibiotica* YIM 31530^T (AY082063) was used as outgroup.
317 Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

Figure 1
[Click here to download Figure: Fig 1_no legend.pptx](#)

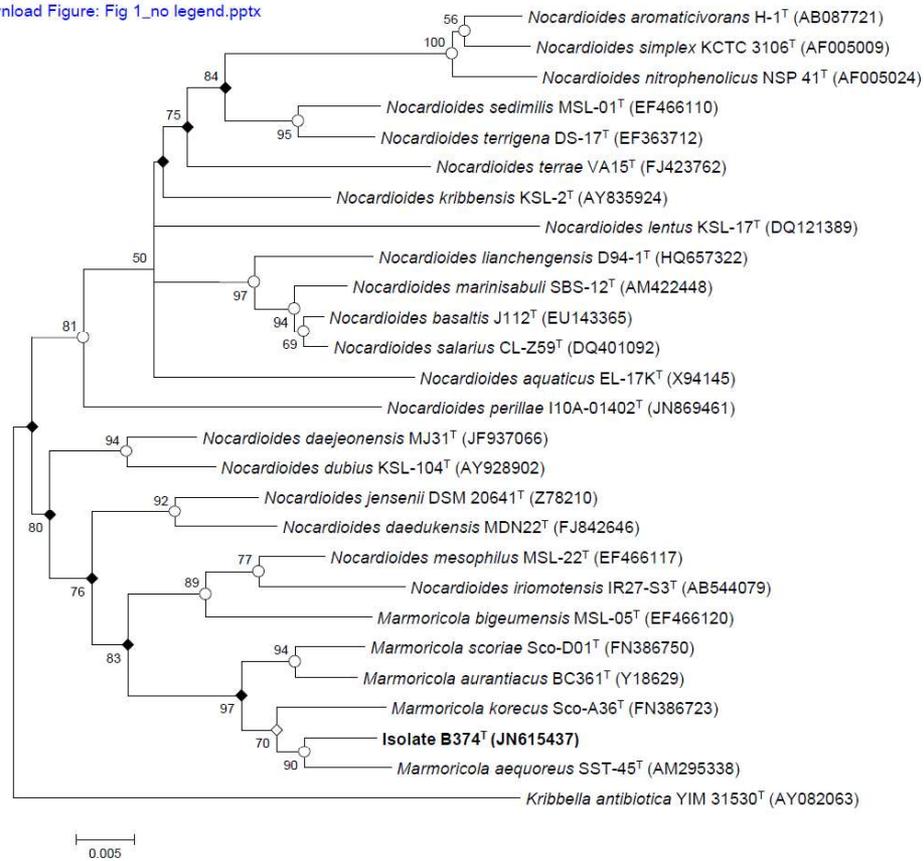


Table S1. Major cellular fatty acid compositions of isolate B374^T and type strains of the genus *Marmoricola*.

Strains: **1.** Isolate B374^T; **2.** *M. korecus* Sco-A36^T; **3.** *M. aequoreus* SST-45^T; **4.** *M. aurantiacus* DSM 12652^T; **5.** *M. bigeumensis* KCTC 19287^T; **6.** *M. scoriae* Sco-D01^T. Data were taken from Lee et al., (2011) and this study. Components comprising <1% of the total fatty acids are not shown.

FAMES	1	2	3	4**	5†	6
C _{12:0}	-	-	2.9	1.0	-	-
C _{14:0} iso	-	-	-	-	4.3	-
C _{14:0}	1.57	2.4	1.2	1.3	1.2	-
C _{15:0} iso	-	-	-	-	5.5	-
C _{15:0} anteiso	-	-	-	-	3.3	-
C _{15:0}	-	8.4	1.1	1.1	2.1	2.1
C _{16:0} iso	-	-	-	-	27.6	2.5
C _{16:0}	27.5	18.1	30.2	37.0	6.8	27.7
C _{15:0} 2-OH	-	1.6	-	-	-	-
C _{16:0} 10-methyl	-	1.3	1.7	2.0	-	1.1
C _{17:0} iso	-	-	-	-	3.5	-
C _{17:0} anteiso	-	-	-	-	5.9	-
C _{17:1} ω8c	15.62	13.6	2.5	2.0	6.9	3.6
C _{17:1} ω6c	-	-	-	-	2.3	1.0
C _{17:0}	7.84	7.0	1.1	-	3.8	2.0
C _{16:0} 2-OH	1.13	7.1	4.3	4.7	-	8.0
C _{16:1} 2-OH	-	-	-	-	3.5	-
C _{17:0} 10-methyl	5.4	4.1	-	-	2.2	1.2
C _{18:1} ω9c	19.07	12.0	26.4	27.0	4.2	25.9
C _{18:0}	-	1.5	2.3	2.1	1.4	1.9
C _{17:0} 2-OH	-	3.0	-	-	-	1.1
C _{18:0} 10-methyl (TBSA‡)	8.08	3.4	7.1	5.4	-	10.2
C _{18:3} ω6c	-	1.3	-	-	-	-
C _{19:0} anteiso	-	-	6.3	3.3	-	-
Feature 3*	12.16	-	-	-	7.5	-
Feature 4*	-	10.3	8.2	9.9	2.6	6.0
Feature 7*	-	-	-	-	1.27	-
Feature 9*	1.63	-	-	-	-	-

*Summed fatty acids that cannot be separated by GLC with the MIDI System. Feature 3 (16:1 ω7c / 16:1 ω6c - 16:1 ω6c / 16:1 ω7c), Feature 4 (C16:1 ω7c and/or iso-C15:0 2-OH), Feature 7 (um 18.846 / 19:1 ω6c / 19:1 ω6c / .846 / 19cy), Feature 9 (17:1 iso ω9c - 16:0 10- methyl).

***M. aurantiacus* DSM 12652T did not contain C16:1, but this was the major fatty acid in the previous report (Urzi et al., 2000).

†*M. bigeumensis* KCTC 19287T also contained iso-C16:1 H (1.3%), iso-C16:0 3-OH (3.0%), iso-C17:1 ω9c (1.8%), anteiso-C17:1 ω9c (1.0%) and feature 8 (C19:1 ω11c and/or unknown 18.756, 1.3%).

‡TBSA, tuberculostearic acid.

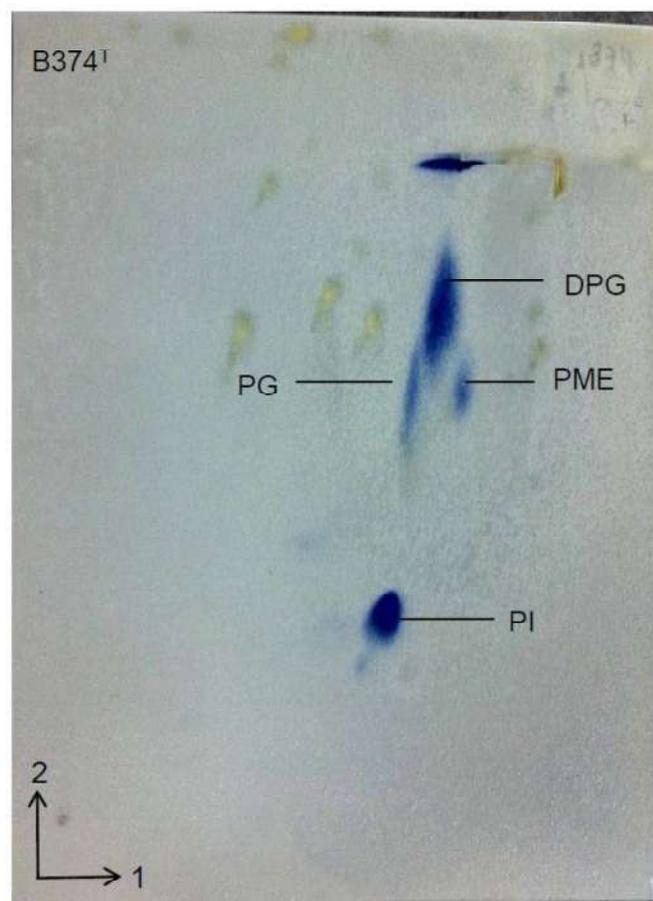


Fig. S1. Two-dimensional TLC of phosphate-containing lipids of *Marmoricola aquaticus* B374^T, stained with molybdenum blue as the spray reagent. DPG, Diphosphatidylglycerol; PME, phosphatidylmethylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain *Marmoricola aquaticus* B374^T is JN615437.

>*Marmoricola aquaticus* B374 CBMAI 1089^T DSM 28169^T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CAGCTCCCCCACAAGGGTTGGGCCACTGGCTTCGGGTGTTGCCAACTTT
CGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAG
CGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTG
CAGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGGGATTTCGCTCCACCTCG
CGGTATCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCTAG
GCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGA
CCCCGGCAGTCTCTTATGAGTCCCCACCATGACGTGCTGGCAACATAAGA
CGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAGCCATGCACCACCTGTAAACGAGTGTCCAAAGAGACCGCTGT
CTCCAGCGGCTTCTCGCCTATGTCAAACCTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGC
GTTAGCTGCGGCACGGAACCGTGAATGAGCCCCACACCTAGCGCCCAA
CGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACAC
TTTCGCTCCTCAGCGTCAGGTAATGCCAGAGAACCGCCTTCGCCACCGG
TGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGTTT
TCCCCTGCATACCTCTAGTCTGCCCGTATCAGAAGCAGGCTCGGGGTTGA
GCCCCGAGTTTTCACTCCTGACGCGACAGACCGCCTACGAGCCCTTTACG
CCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGTAGTTGGCCGGTGTCTTCTGCGCATAACCGTCACTTTTCGCTTCG
TCTGCGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGC
GTTGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCT
CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACCTC
TCAGGCCGGCTACCCGTCGAAGCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACAA
GCTGATAGGCCGCGAGCTCATCCTCCACCGCCAGAAGTTTCCACCACCAA
CACATGCGTGTAGTGGTCATATCCGGTATTAGCTCCCGTTTTCCGGGGTT
ATCCCAGAGTGAAGGGCAGATTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCGC
TCGTGTACCCCGAAGGGCCTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGC
CGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCA
```

APÊNDICE II

Tabela S1. Fonte e meios de isolamento dos isolados da primeira coleta.

Isolado	Isolamento		Isolamento		Isolamento		Isolamento		Isolamento		Isolamento						
	Fonte*	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado					
100	1	M1	121	2	GPY	147	4	TSA	168	6	MA	190	8	MA	212	5	GPY
101	1	M1	122	2	GPY	148	9	TSA	169	6	TSA	191	6	TSA	214	3	M1
102	1	M1	123	2	GPY	149	3	TSA	171	3	TSA	192	5	MA	215	8	M1
103	2	M1	124	2	GPY	150	2	TSA	172	2	M1	193	7	MA	216	6	TSA
104	2	M1	126	2	GPY	151	5	TSA	173	5	MA	194	6	TSA	217	3	MA
105	2	M1	128	2	GPY	152	8	TSA	174	4	TSA	195	2	M1	219	1	PCA
106	2	M1	132	1	GPY	153	5	TSA	175	2	TSA	196	9	TSA	220	4	MA
107	1	TSA	133	1	MA	154	5	TSA	176	4	TSA	197	9	TSA	221	5	MA
108	1	TSA	134	1	MA	155	4	TSA	177	2	TSA	198	6	M1	222	5	TSA
109	1	TSA	135	2	MA	156	2	TSA	178	4	TSA	199	2	TSA	223	8	TSA
110	1	TSA	136	4	MA	157	5	TSA	179	4	TSA	200	7	TSA	224	2	TSA
111	2	TSA	137	7	TSA	158	5	TSA	180	3	MA	201	2	TSA	226	6	MA
112	2	TSA	138	7	TSA	159	3	MA	181	5	MA	202	4	TSA	227	2	GPY
113	2	TSA	139	5	PCA	160	2	TSA	182	3	MA	203	1	PCA	228	5	MA
114	2	TSA	140	5	PCA	161	9	TSA	183	4	MA	204	6	M1	229	3	TSA
115	1	TSA	141	9	MA	162	8	TSA	184	4	MA	206	3	TSA	230	5	TSA
116	1	TSA	142	6	PCA	163	3	TSA	185	4	TSA	207	5	TSA	231	5	GPY
117	2	M1	143	4	TSA	164	4	MA	186	3	TSA	208	1	PCA	232	6	GPY
118	1	TSA	144	2	MA	165	3	MA	187	4	TSA	209	6	PCA	233	6	GPY
119	1	TSA	145	4	MA	166	4	MA	188	8	MA	210	2	TSA	235	1	TSA
120	1	M1	146	3	MA	167	6	MA	189	4	MA	211	2	TSA	236	6	MA

Tabela S1. Continuação.

Isolado	Isolamento		Isolado		Isolamento		Isolado		Isolamento		Isolado		Isolamento		Isolado		Isolamento		
	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte	Meio	Isolado	Fonte
237	6	MA	263	7	M1	304	8	M1	330	6	M1	362	7	GPY	405	5	GPY		
238	6	M1	264	7	M1	305	9	M1	331	6	M1	363	4	GPY	406	3	GPY		
239	4	M1	265	7	M1	307	9	M1	332	6	TSA	365	4	M1	407	1	GPY		
240	2	M1	266	9	GPY	308	5	M1	335	5	M1	366	5	M1	408	4	GPY		
241	4	M1	267	4	GPY	309	3	M1	336	5	M1	367	8	M1	409	7	GPY		
242	9	M1	269	1	M1	310	3	M1	337	7	M1	368	5	GPY	410	4	MA		
243	6	M1	274	1	GPY	311	3	M1	338	5	M1	369	7	TSA	411	4	TSA		
244	4	M1	275	8	M1	313	3	M1	339	6	M1	370	7	M1	412	3	MA		
245	4	M1	276	4	M1	314	3	M1	340	2	GPY	371	7	M1	413	1	M1		
247	1	M1	277	9	M1	315	5	M1	341	9	M1	372	5	GPY	415	1	GPY		
248	2	M1	278	9	M1	316	5	M1	342	5	GPY	373	8	M1	416	3	GPY		
249	4	M1	279	4	M1	317	3	M1	344	8	MA	374	8	M1	417	3	GPY		
250	6	M1	280	7	M1	320	5	GPY	345	5	GPY	375	8	M1	418	1	GPY		
251	4	M1	281	7	M1	321	3	GPY	346	6	GPY	377	7	TSA	419	4	GPY		
252	6	M1	282	4	M1	322	6	TSA	347	6	GPY	378	4	GPY	420	4	TSA		
253	2	M1	285	7	M1	323	6	M1	350	6	MA	380	7	M1	421	5	GPY		
254	8	M1	287	9	M1	324	5	TSA	352	6	MA	382	3	GPY	422	8	M1		
255	9	M1	288	9	M1	325	5	M1	355	6	GPY	383	4	GPY	423	8	M1		
256	1	GPY	290	3	GPY	326	5	M1	358	5	M1	384	4	M1	424	9	GPY		
259	7	M1	297	8	M1	327	5	M1	359	7	M1	385	4	GPY	425	1	TSA		
260	4	M1	299	1	GPY	328	3	M1	360	1	GPY	386	3	M1	426	5	M1		
262	7	M1	303	1	GPY	329	6	M1	361	3	M1	387	5	MA	427	7	TSA		

Tabela S1. Continuação.

Isolado	Isolamento		Isolado		Isolamento		Isolado		Isolamento		Isolado		Isolamento				
	Fonte	Meio	Fonte	Meio	Fonte	Meio	Fonte	Meio	Fonte	Meio	Fonte	Meio	Fonte	Meio			
428	6	M1	443	7	MA	458	2	GPY	473	6	M1	489	6	TSA	505	3	M1
429	7	TSA	444	5	M1	459	8	M1	474	5	M1	490	4	M1	506	7	MA
430	7	MA	445	4	M1	460	5	M1	475	9	GPY	491	1	MA	507	5	GPY
431	5	M1	446	4	GPY	461	5	M1	476	2	GPY	492	5	TSA	508	5	M1
432	4	M1	447	8	MA	462	5	M1	477	6	M1	493	7	TSA	509	3	M1
433	4	GPY	448	8	MA	463	5	M1	478	5	M1	494	5	TSA			
434	5	M1	449	1	GPY	464	5	M1	479	6	M1	496	2	M1			
435	5	M1	450	2	GPY	465	7	M1	480	7	M1	497	2	M1			
436	2	M1	451	4	M1	466	3	MA	481	5	M1	498	8	GPY			
437	9	GPY	452	8	M1	467	6	GPY	482	7	M1	499	3	GPY			
438	3	TSA	453	2	M1	468	5	TSA	483	2	GPY	500	4	GPY			
439	3	M1	454	8	M1	469	5	M1	484	8	M1	501	5	M1			
440	4	GPY	455	1	TSA	470	5	M1	485	6	M1	502	4	MA			
441	4	M1	456	1	GPY	471	7	M1	487	8	M1	503	3	M1			
442	5	GPY	457	1	PCA	472	5	MA	488	5	GPY	504	6	M1			

*Fonte de isolamento: 1. Esponja *Dragnacidon reticulata*; 2. Alga *Sargassum*; 3. Esponja *Micalia angulosa*; 4. *Ascidia Didemnum ligulum*; 5. Esponja *Micalia laxissima*; 6. *Ascidia Didemnum* sp.; 7. Esponja *Amphimedon viridis*; 8. Esponja *Glodia corticostylifera*; 9. Esponja *Axinella corrugata*.

APÊNDICE III

Tabela S2. Isolados utilizados para a validação dos *primers* grupo-específicos para actinobactérias.

Isolados	Gênero	Classe
CBMAI 534 ^T	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Betaproteobacteria
CBMAI 305	<i>Chromobacterium</i> sp.	Betaproteobacteria
B255	<i>Janibacter</i>	Actinobacteria
B266	<i>Micrococcus</i>	Actinobacteria
B305	<i>Microbacterium</i>	Actinobacteria
B506	<i>Saccharopolyspora</i>	Actinobacteria
B522	<i>Acinetobacter</i>	Gamaproteobacteria
B523	<i>Vibrio</i>	Gamaproteobacteria
B536	<i>Staphylococcus</i>	Firmicute
B562	<i>Erythrobacter</i>	Alfaproteobacteria
B570	<i>Aquimarina</i>	Bacterioidetes
B572	<i>Bacillus</i>	Firmicute
B618	<i>Pseudovibrio</i>	Alfaproteobacteria
B722	<i>Bacillus</i>	Firmicute
B730	<i>Ruegeria</i>	Alfaproteobacteria

APÊNDICE IV

Tabela S3. Características dos isolados classificados como Gram- positivos oriundos da segunda coleta. Isolados incubados a 28°C.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
525	Água do mar	MA/ASW	Bege, gomosa	Bastonete	nd
511	<i>Chelonapyysiela erecta</i>	TSA/ASW	Laranja, brilhante	Cocos	<i>Exiguobacterium sp.</i>
516	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege, esbranquiçada, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus sp.</i>
517	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Branca (centro), borda transparente	Bastonete	<i>Bacillus sp.</i>
519	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Bege amarelada, brilhante	Bastonete	nd
521	<i>Echinaster brasiliensis</i>	M1/ASW	Amarela escura, brilhante	Bastonete	<i>Curtobacterium sp.</i>
526	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Branca amarelada	Bastonete	<i>Bacillus sp.</i>
527	Água do mar	M1/ASW	Amarela, brilhante	nd	nd
528	Água do mar	ISP2/ASW	Salmão clara, opaca	Cocos	<i>Staphylococcus sp.</i>
529	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Branca transparente, brilhante	Bastonete	nd
532	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW	Branca transparente, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus sp</i>
534	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW	Branca transparente	Cocos	<i>Staphylococcus sp</i>
535	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Branca amarelada	Cocos	<i>Staphylococcus sp</i>
536	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW	Amarela clara	Cocos	<i>Staphylococcus sp</i>

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
537	Água do mar	M1/ASW	Branca transparente	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
539	<i>Echinaster brasiliensis</i>	M1/ASW	Amarela, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
541	Água do mar	TSA/ASW	Amarela clara, brilhante	Bastonete	nd
543	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege amarelada	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
544	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Bege, brilhante	Bastonete longo	<i>Bacillus</i> sp.
545	Água do mar	M1/ASW	Bege	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
546	Água do mar	M1/ASW	Branca	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
548	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW	Bege clara	Cocos	<i>Ruegeria</i> sp.
549	Água do mar	TSA/ASW	Bege	Bastonete	nd
551	Água do mar	TSA/ASW	Amarela, brilhante	Bastonete	nd
553	Água do mar	TSA/ASW	Laranja clara	Bastonete	nd
558	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege clara, brilhante, forma irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
559	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Bege translúcida, brilhante	Cocos	nd
563	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Amarela translúcida	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
564	Água do mar	TSA/ASW	Bege translúcida, brilhante	Bastonete	nd nd
565	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Branca, forma irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
566	Água do mar	TSA/ASW	Amarela, cremosa	Cocos	<i>Micrococcus</i> sp.
571	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Bege translúcida	nd	nd
572	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Amarela, opaca	Bastonete	<i>Bacillus simplex</i>
573	Água do mar	TSA/ASW	Branca translúcida, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
574	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Branca translúcida	nd	nd
577	<i>Codium intertextum</i>	MA/ASW	Branca translúcida	nd	nd
580	Água do mar	MA/ASW	Amarela escura, brilhante	Bastonete	nd
583	Água do mar	MA/ASW	Amarela, brilhante	Bastonete	nd
586	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege translúcida	Bastonete curto	nd
588	Água do mar	M1/ASW	Bege clara, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
589	<i>Dragmacidon reticulata</i>	M1/ASW	Laranja	Bastonete	<i>Bacillus barbaricus</i>
590	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Amarela	Bastonete	<i>Bacillus megaterium</i>

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
591	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Branca translúcida	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp
592	Água do mar	M1/ASW	Branca, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
593	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Branca cremosa, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
594	Água do mar	M1/ASW	Bege gomosa, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
595	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Bege clara, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus niabiensis</i>
596	<i>Dragnacidon reticulata</i>	M1/ASW	Bege translúcida	Cocos	<i>Corynebacterium</i>
598	Água do mar	M1/ASW	Bege alaranjada, brilhante	Cocos	nd
600	Água do mar	M1/ASW	Branca translúcida, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
601	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Branca translúcida, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
604	Água do mar	M1/ASW	Bege clara	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
609	Água do mar	M1/ASW	Branca translúcida	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
610	Água do mar	M1/ASW	Laranja	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
611	Água do mar	M1/ASW	Amarela alaranjada	Cocos	<i>Staphylococcus</i>
612	<i>Codium intertextum</i>	MA/ASW	Bege amarelada	Cocos	<i>Micrococcus</i>

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
613	<i>Dragmacidon reticulata</i>	MA/ASW	Bege translúcida, brilhante	nd	nd
614	Água do mar	MA/ASW	Laranja, brilhante	Bastonete	nd
616	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege clara, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
620	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	branca brilhante	Cocos	<i>Bacillus</i>
621	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Rosa translúcida	Cocos	nd
623	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Branca, brilhante	Cocos	<i>Bacillus</i> sp.
624	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Bege clara, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
628	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	nd	Cocos	nd
629	<i>Chelonaplysiela erecta</i>	TSA/ASW	Bege gomosa	nd	nd
631	<i>Chelonaplysiela erecta</i>	TSA/ASW	Bege gomosa	nd	nd
633	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege, brilhante	nd	nd
638	Água do mar	MA/ASW	Bege clara translúcida	Bastonete	nd
640	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Branca, cremosa, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus pumilus</i>
641	Água do mar	MA/ASW	Bege translúcida, brilhante	Bastonete	nd

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
642	Água do mar	ISP2/ASW	Amarela, opaca	Cocos	<i>Micrococcus</i> sp.
645	Água do mar	ISP2/ASW	Branca rugosa, opaca	Bastonete	<i>Streptomyces kunmingensis</i>
648	<i>Echinaster brasiliensis</i>	M1/ASW	Bege clara translúcida	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
649	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege gomosa, brilhante	nd	nd
651	Água do mar	AA/ASW	Branca translúcida	Bastonete	nd
652	Água do mar	AA/ASW	Branca translúcida	Bastonete	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
653	Nudibrânquio <i>Tambja</i> sp.	MA/ASW	Branca translúcida, brilhante	Cocos	nd
654	Água do mar	MA/ASW	Bege translúcida, brilhante	nd	nd
656	Água do mar	MA/ASW	Bege clara translúcida, brilhante	Bastonete	nd
662	Nudibrânquio <i>Tambja</i> sp.	ISP2/ASW	Branca translúcida, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
663	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Bege, brilhante	nd	nd

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
668	Água do mar	MA/ASW	Bege clara, brilhante	Bastonete	nd
669	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege translúcida, brilhante	nd	nd
670	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege translúcida, brilhante	Bastonete	nd
671	<i>Codium intertextum</i>	TSA/ASW	Branca, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus sp.</i>
673	<i>Dragmacidon reticulata</i>	MA/ASW	Bege translúcida	nd	nd
679	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege, brilhante	Bastonete	nd
681	Água do mar	MA/ASW	Rosa cremosa, brilhante	Bast. (vibrio)	nd
682	Água do mar	ISP2/ASW	Amarela	Cocos	<i>Micrococcus sp.</i>
683	Água do mar	ISP2/ASW	Bege translúcida, brilhante	Cocos	nd
685	<i>Echinaster brasiliensis</i>	TSA/ASW	Branca, brilhante	Cocos	nd
686	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW	Bege clara, brilhante	Cocos	nd
687	Água do mar	MA/ASW	Bege clara translúcida, brilhantegomosa	nd	nd
688	Água do mar	M1/ASW	Bege clara translúcida, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus sp.</i>
692	<i>Chelonaplysilla erecta</i>	MA/ASW	Bege, brilhante	nd	nd

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
694	<i>Dragmacidon reticulata</i>	TSA/ASW	Branca, brilhante	Cocos	nd
695	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege clara, superfície irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
696	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege, irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
697	<i>Petronica citrina</i>	TSA/ASW	Bege cremosa, gomosa, brilhante	Bastonete	nd
702	Água do mar	M1/ASW	Branca, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
703	Água do mar	M1/ASW	Bege clara translúcida, brilhante	Cocos	<i>Staphylococcus</i> sp.
704	Água do mar	M1/ASW	Branca, brilhante	nd	nd
705	<i>Codium intertextum</i>	M1/ASW	Bege cremosa, brilhante	nd	nd
707	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Bege clara translúcida, irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
709	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Branca irregular	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
711	<i>Chelonaplysiela erecta</i>	MA/ASW	Bege com centro cremoso e borda translúcida, brilhante	Bastonete	<i>Staphylococcus saphrophiticus</i>
714	Água do mar	AA/ASW	Branca translúcida	nd	nd
715	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	Bege clara, brilhante	Bastonete	<i>Bacillus</i> sp.
716	<i>Codium intertextum</i>	MA/ASW	Bege translúcida, brilhante	Bastonete	nd

Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
717	<i>Codium intertextum</i>	MA/ASW	Amarela clara, brilhante	Bastonete	nd
719	<i>Nudibrânquio Tambja sp.</i>	M1/ASW	nd	Cocos	<i>Staphylococcus aureus</i>
722	<i>Axinella corrugata</i>	M1/ASW	nd	Bastonete	<i>Bacillus pumilus</i>
723	<i>Ophidiasteridae</i>	TSA/ASW	nd	Cocos	<i>Bacillus circulans</i>
725	Água do mar	MA/ASW	nd	Bastonete	<i>Bacillus sp.</i>
726	Água do mar	ISP2/ASW	nd	Cocos	nd
727	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW	nd	Cocos	<i>Staphylococcus sp</i>
728	<i>Axinella corrugata</i>	TSA/ASW	nd	Bastonete	nd
729	<i>Axinella corrugata</i>	M1/ASW	Bege, opaca	Bastonete	<i>Mycobacterium sp</i>
731	Água do mar	AA/ASW	Bege escura, opaca	Bastonete	<i>Streptomyces sp.</i>
732	<i>Codium intertextum</i>	AA/ASW	nd	Cocos	<i>Staphylococcus sp.</i>
734	<i>Petronica citrina</i>	M1/ASW	nd	Cocos	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
735	Água do mar	ISP2/ASW	nd	Bastonete	<i>S. kunmingensis</i>

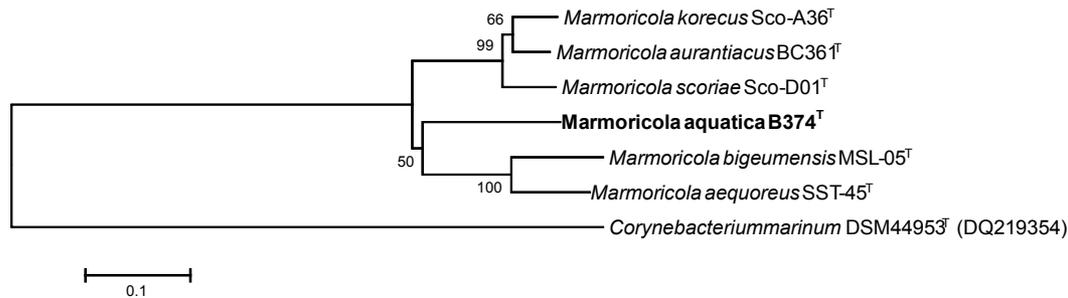
Tabela S3. Continuação.

Isolado	Fonte de isolamento	Meio de isolamento	Características da colônia	Morfologia da célula	Identificação
736	Água do mar	M1/ASW	Bege, opaca	Cocos	<i>Serinicoccus sp.</i>
737	Água do mar	M1/ASW	nd	Bastonete	nd
738	Água do mar	M1/ASW	nd	Bastonete	<i>Streptomyces sp.</i>
739	Água do mar	M1/ASW	Amarela clara	Bastonete	<i>Sacharopolyspora sp.</i>
740	Água do mar	M1/ASW	nd	Bastonete	nd
741	Água do mar	M1/ASW	nd	Bastonete	nd
742	Água do mar	TSA/ASW	Bege cremosa	Cocos	<i>Janibacter sp.</i>
743	Água do mar	M1/ASW	nd	Bastonete	nd

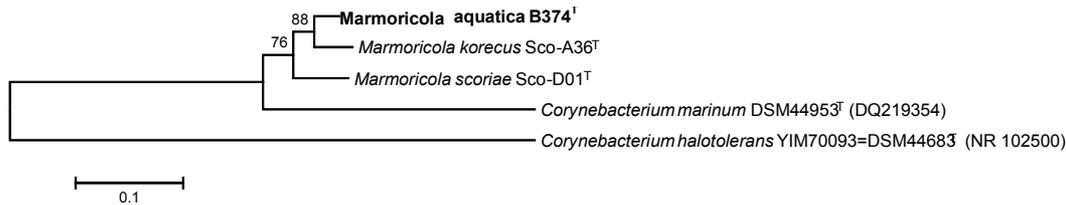
APÊNDICE V

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Marmoricola*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *rpoA*; **C.** gene *gyrB*; **D.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstraps* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

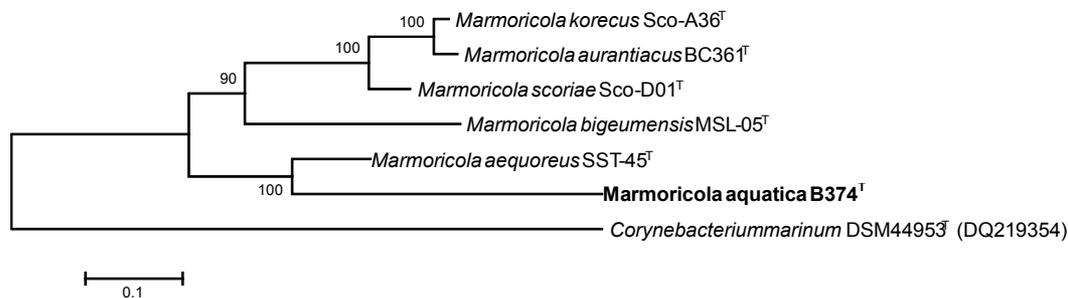
A



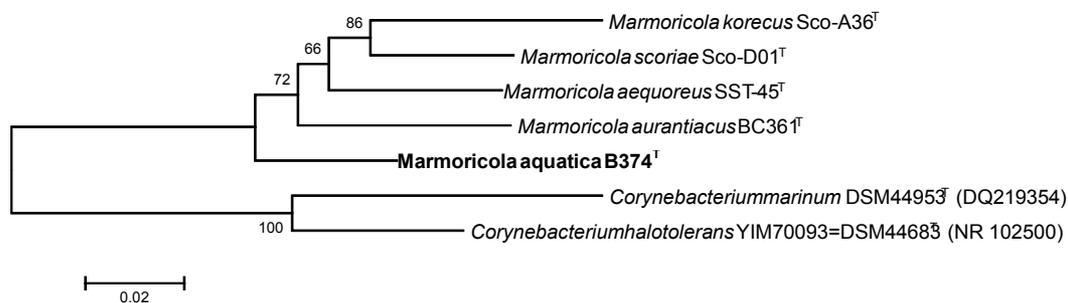
B



C



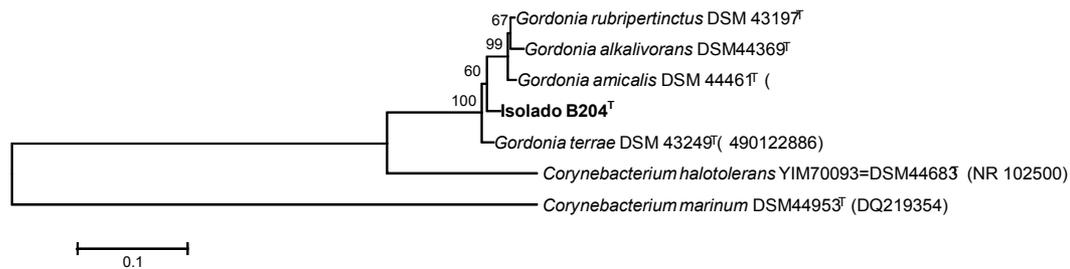
D



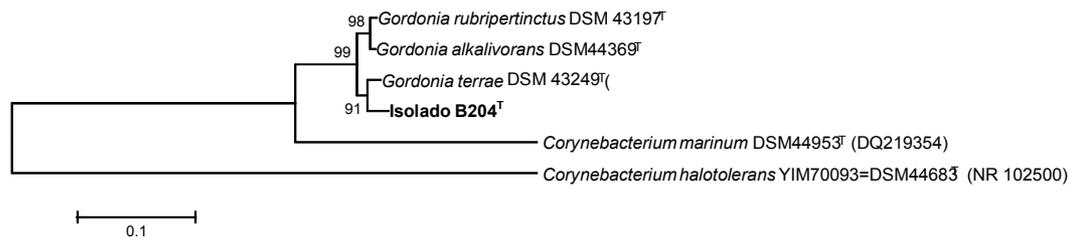
APÊNDICE VI

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Gordonia*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *rpoA*; **C.** gene *gyrB*; **D.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

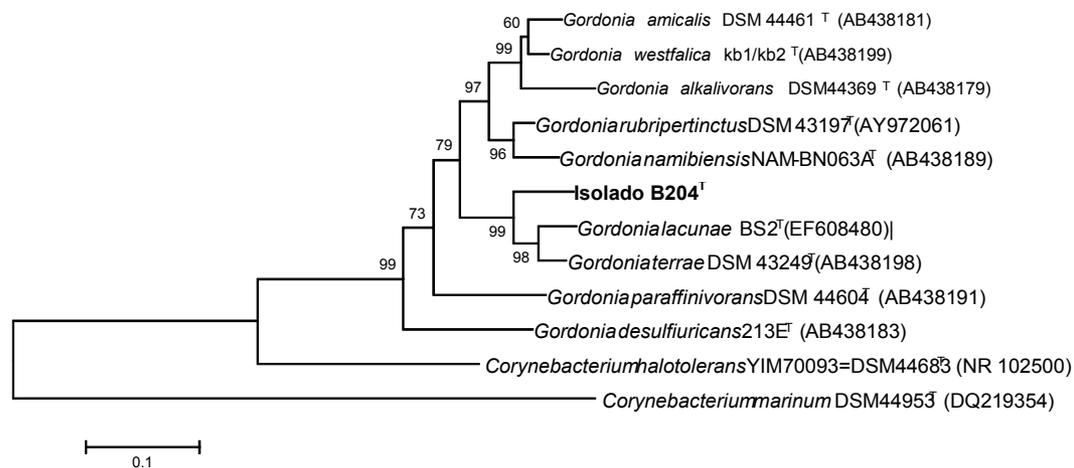
A



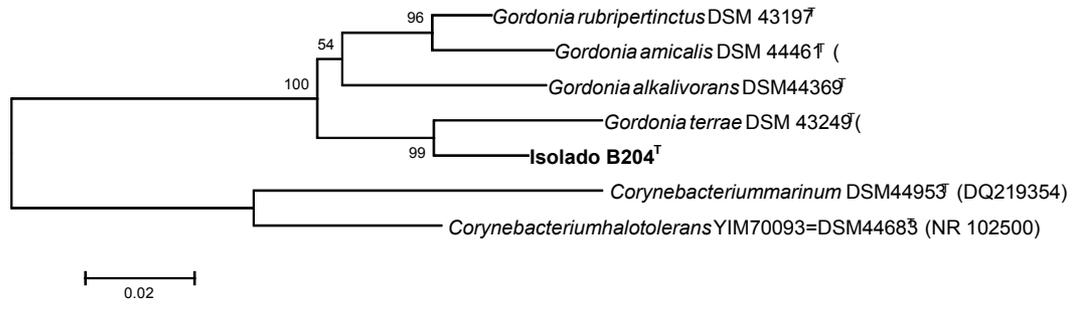
B



C



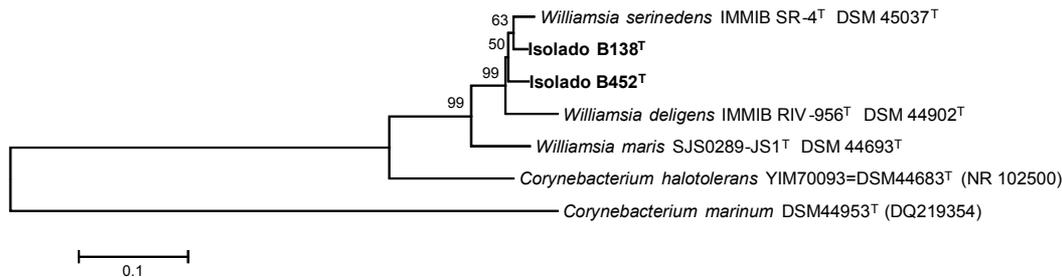
D



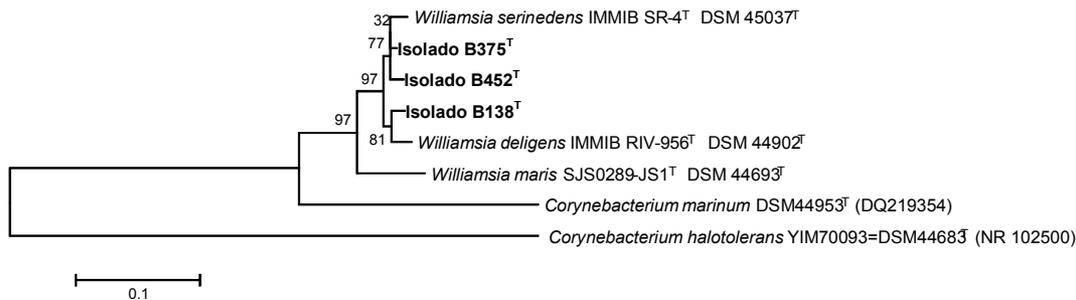
APÊNDICE VII

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Williamsia*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *rpoA*; **C.** gene *gyrB*; **D.** gene *trpB*; **E.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

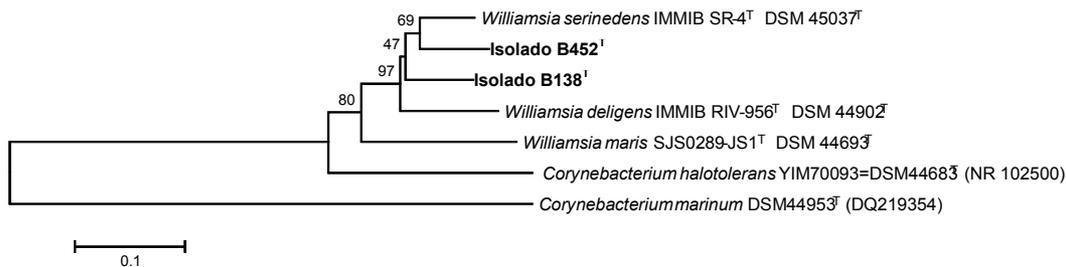
A



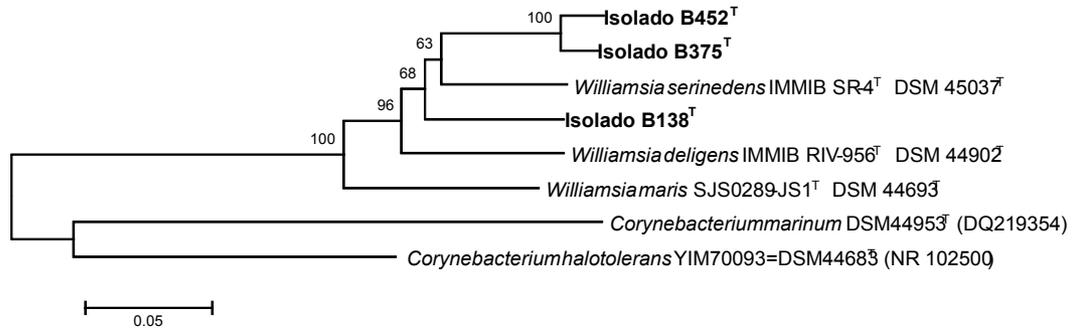
B



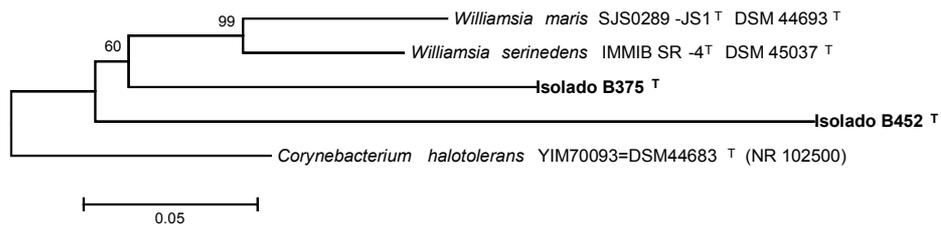
C



D



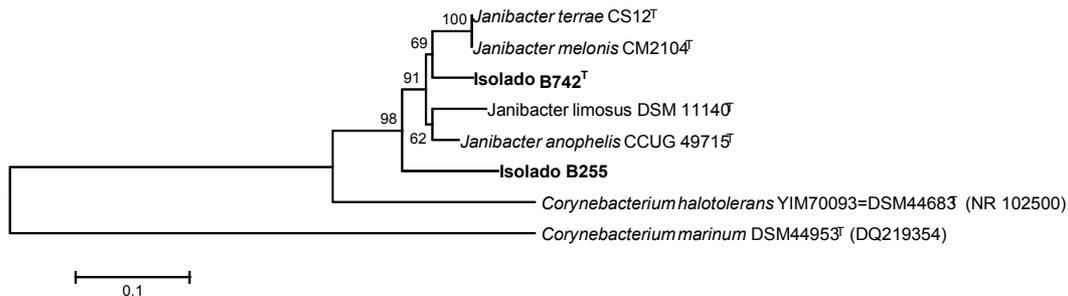
E



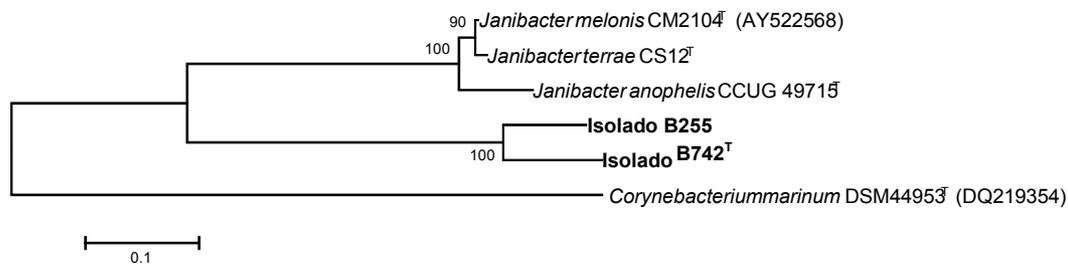
APÊNDICE VIII

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Janibacter*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *gyrB*; **C.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

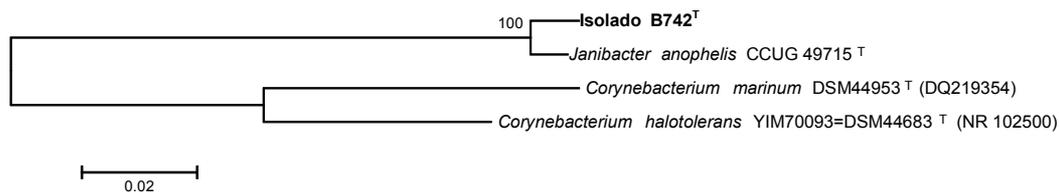
A



B



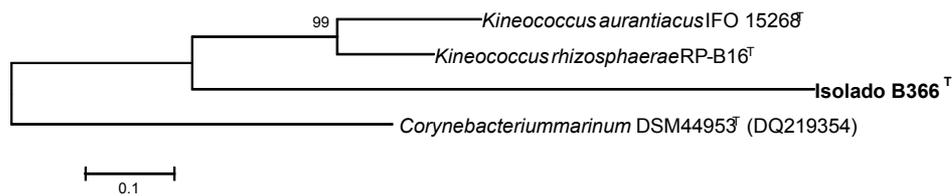
C



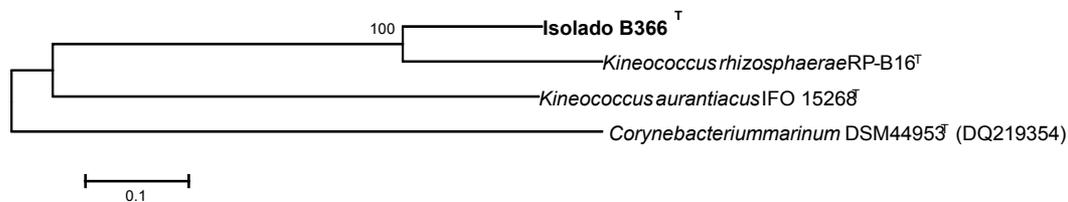
APÊNDICE IX

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Kineococcus*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *gyrB*; **C.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

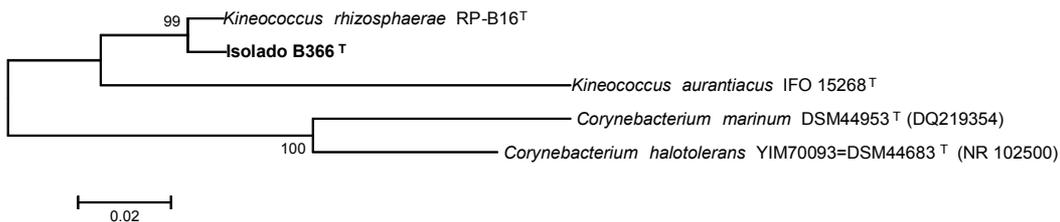
A



B

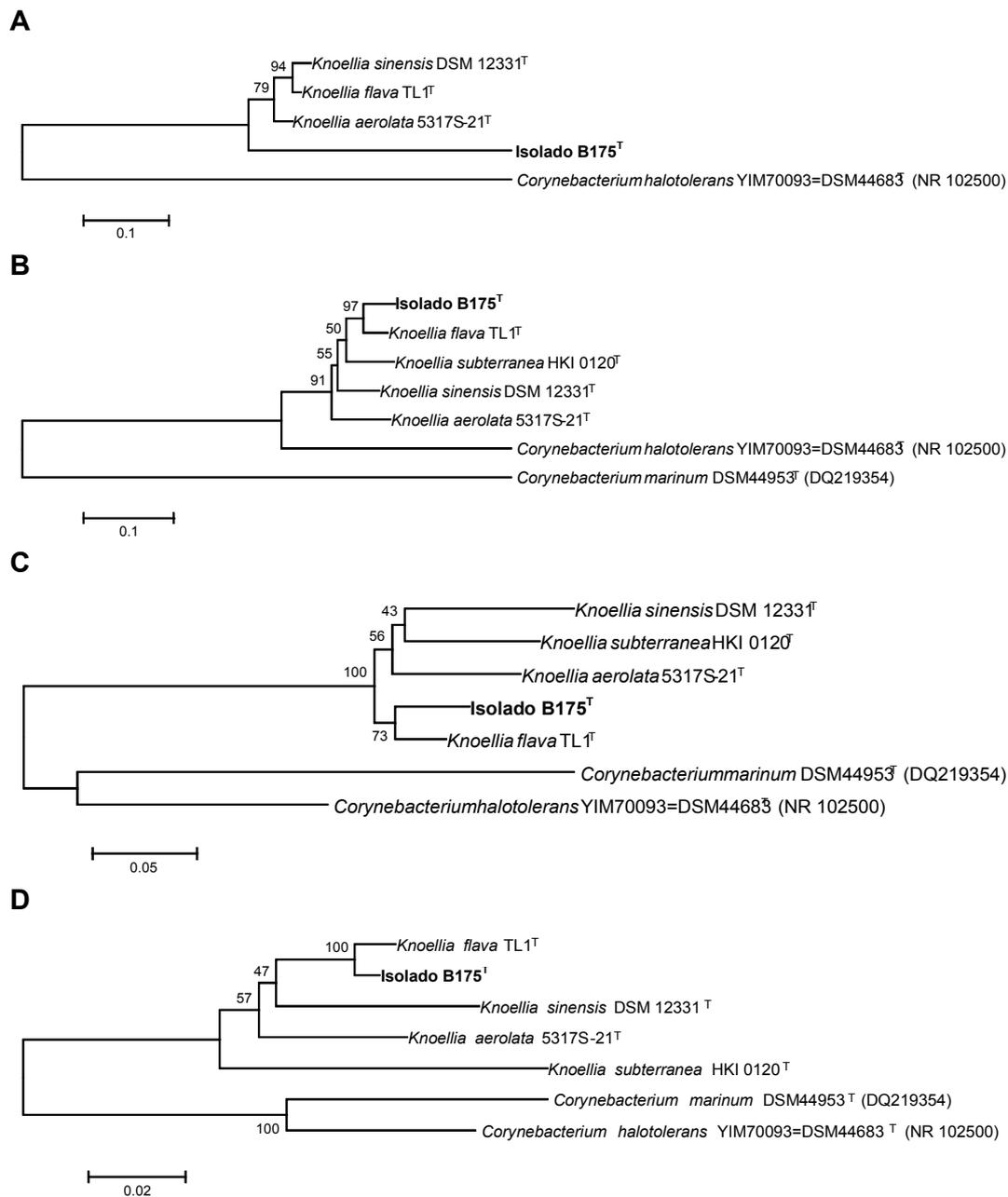


C



APÊNDICE X

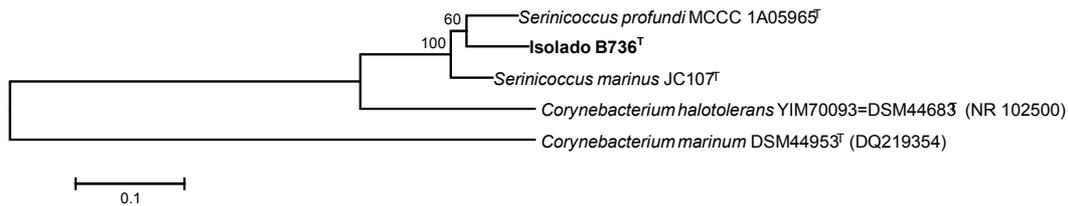
Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Knoellia*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoA*; **B.** gene *gyrB*; **C.** gene *trpB*; **D.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.



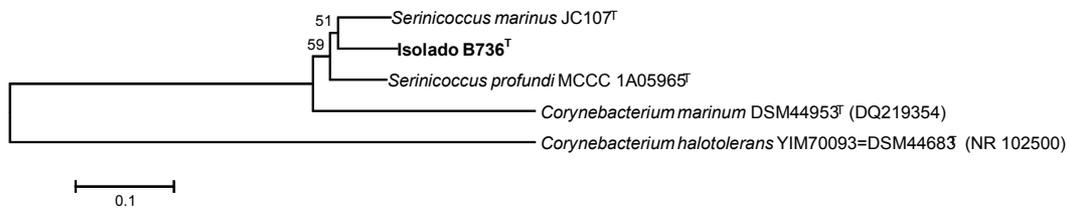
APÊNDICE XI

Análises filogenéticas dos isolados de actinobacteria pertencentes ao gênero *Serinicoccus*, com base em sequências dos genes: **A.** gene *rpoB*; **B.** gene *rpoA*; **C.** gene *gyrB*; **D.** gene *trpB*; **E.** gene *recA*. Distâncias evolucionárias baseadas no modelo de Jukes-Cantor e reconstrução da árvore pelo método de Neighbour-Joining. Valores de *Bootstrap* 1.000 (1000 replicatas). *Corynebacterium halotolerans* YIM70093^T = DSM 44683^T (NR 102500) e *Corynebacterium marinum* DSM 44953^T (DQ219354) foram utilizadas como *outgroup*.

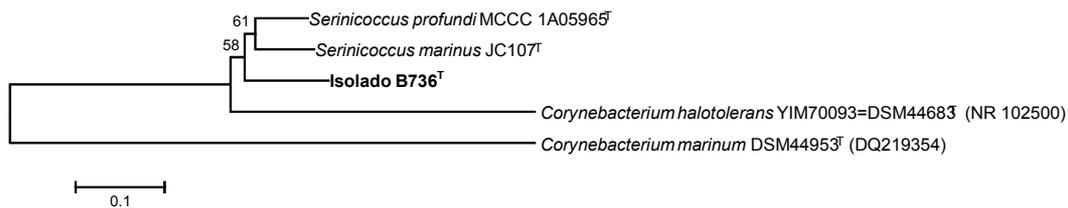
A



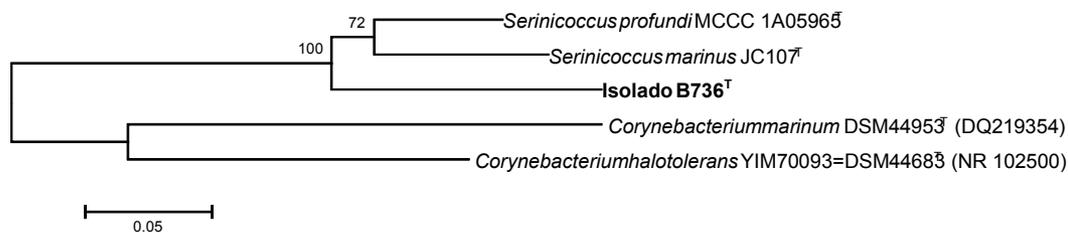
B



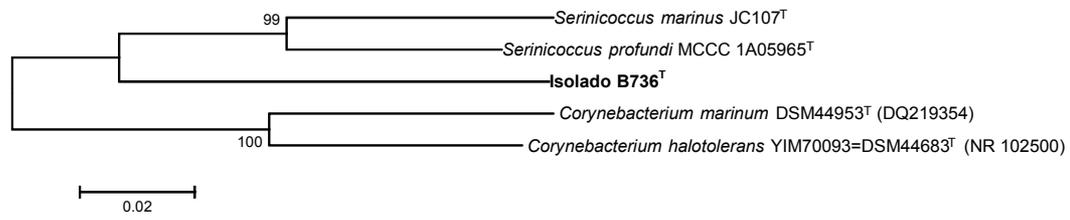
C



D



E



8. ANEXOS

ANEXO 1. SOLUÇÕES

Tampão citrato de sódio (SSC) 20x

Citrato de sódio	0,3 M
NaCl	3 M
Água destilada qsp	100 mL
pH	8,0

Diluir a solução para SSC 0,1X

Solução Lugol/Iodina

Iodina	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada qsp	100 mL

ANEXO 2. MEIOS DE CULTIVO

GYA - Glicose – Extrato de Levedura (Gordon & Mihm, 1962)

Glicose	10 g
Extrato de levedura	10 g
Ágar	16 g
Água destilada qsp	1000 mL
pH	7,2 ± 0,22

ISP1 - Ágar Extrato de Triptona (Shirling & Gottlieb, 1996)

Triptona bacteriológica	5 g
Extrato de levedura bacteriológica	3 mL
Ágar	15 g
Água destilada qsp	1000 mL
pH	7,2 ± 0,2

ISP2 - Ágar Glicose - Extrato de Levedura - Extrato de Malte (Shirling & Gottlieb, 1966)

Glicose	4 g
Extrato de Levedura	4 g
Extrato de Malte	10 g
CaCO ₃	2 g
Ágar	15 g
Água destilada qsp	1000 mL
pH	7,2 ± 0,2

ISP3- Extrato de Aveia Ágar (Shirling & Gottlieb, 1966)

Filtrado de aveia*	1000 mL
Solução traço de sais**	1 ml
Ágar	15 g
pH	7,2 ± 0,2

*Filtrado de aveia: Adicionar 20 g de aveia em 1000 mL de água destilada e cozinhar por 20 minutos. Filtrar o caldo em gaze estéril e completar o volume para 1000 mL.

****Solução traço de sais (estoque):**

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnCl·4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Água destilada	100 mL

Filtrar a solução em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) e estocar a 4° C.

ISP4 - Ágar Amido – Sais Inorgânicos Ágar (Shirling & Gottlieb, 1966)

K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	2 g
Solução de amido solúvel***	500 mL
Ágar	15 g
Água destilada	500 mL
pH	7,2 ± 0,2

*****Solução de amido solúvel:** Adicionar 10 g de amido solúvel em 500 mL de água destilada e homogeneizar por meio de aquecimento.

ISP5 - Ágar Glicerol - Asparagina (Shirling & Gottlieb, 1966)

L-asparagina	1 g
Glicerol	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Solução traço de sais**	1 mL
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8 ± 0,2

**Solução traço de sais: ver ISP3.

ISP7 - Ágar Tirosina (Shirling & Gottlieb, 1966)

Glicerol	15 g
L-Tirosine	0,5 g
L-Asparagina	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Água destilada	1000 mL
Solução traço de sais**	1,0 mL
Ágar	20.0 g
pH	7,2 ± 0,2

**Solução traço de sais: ver ISP3.

ISP9 - Meio mínimo para fonte de carbono (Shirling & Gottlieb, 1966)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5,65 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Solução de sais Pridham & Gottlieb****	1 mL
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8 ± 0,2

****Solução de sais Pridham & Gottlieb:

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 g
Água destilada	100 mL

Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972)

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água destilada	1000 mL

Meio Sierra's - Degradação de Tweens (Sierra, 1957)

Peptona bacteriana	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,1 g
**Solução de Tween	10 mL
Ágar	15 g
Água destilada qsp	1000 mL
pH	7,4

**Autoclavar separadamente o Tween em água destilada. Utilizar 10 mL da solução para concentração final de 1,0 % (v/v).

Meio para degradação Gelatina (Gordon et al., 1974)

KH ₂ PO ₄	9,1 g
Na ₂ HPO ₄	9,5 g
Extrato de levedura	0,1 g
Vermelho de fenol	0,01 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

Solução de gelatina: autoclavar separadamente gelatina em água destilada e adicionar ao meio para concentração de 0,4%.

Solução tampão para teste de tolerância a pH

O tampão fosfato (0.2 M) foi preparado nas concentrações de pH de 4,0; 5,0; 9,0 e 10,0 a partir da combinação das soluções tamponantes A (fosfato de potássio monobásico 0,2 M) e tampão B (fosfato de potássio dibásico 0,2 M) nas proporções de 199,7:0,3; 197,3:2,7; 1,4:198,6 e 1:199,9, respectivamente. Cada 200 mL de tampão estéril foi adicionado a 200 mL de meio Bennett's, estéril para um volume final de 400 mL.

Bennett's Ágar modificado (Jones, 1949)

Extrato de levedura	1 g
Lab-LEMCO	0,8 g
Casitona bacteriana	2 g
Glicerol	10 g
Ágar	15 g
pH	7,2 ± 0,2