



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

***Screening* farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil**

RECIFE
2017

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Coorientador: Dr. Carlos Daniel Pérez

RECIFE

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

M528s	Melo, Liany Figuerêdo de Andrade. <i>Screening</i> farmacológico e diversidade bacteriana do muco de <i>Palythoa caribaeorum</i> (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil / Liany Figuerêdo de Andrade Melo. – Recife: o autor, 2017. 96 f.; il.; 30 cm. Orientadora: Ivone Antônia de Souza. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. Microbiologia marinha. 2. Atividade enzimática. 3. Toxinas bacterianas. 4. Biotecnologia marinha. 5. Anthozoa. 6. Controle biológico. 7. Taxonomia molecular. I. Souza, Ivone Antônia de (orientadora). II. Título. 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017 - 305)
-------	--

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos.

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto.

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Luiz Alberto Lira Soares

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. José Lamartine Soares Sobrinho

RECIFE

2017

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 12 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Presidente)

*Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco*

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva
(Titular Interna)

*Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco*

Prof.^a Dr.^a Jane Sheila Higino
(Titular Externa)

*Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco*

Prof. Dr. Leandro Finkler
(Titular Externo)

*Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de
Vitória, Universidade Federal de Pernambuco*

Prof.^a Dr.^a Idjane Santana de Oliveira
(Titular Externa)

*Núcleo de Enfermagem, Centro Acadêmico de
Vitória, Universidade Federal de Pernambuco*

Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser Santos
(Suplente Interna)

*Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco*

Prof.^a Dr.^a Gláucia M. de Souza Lima
(Suplente Externa)

*Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco*

*Aos meus pais, Nanci e Nelson, minhas fontes de força e
de coragem para enfrentar os desafios.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha razão de existir, por ter me direcionado e me dado forças para percorrer essa jornada. Esta pesquisa tem sido uma fonte de amadurecimento e aprendizado, marcada por uma série de desafios que só puderam ser superados com a ajuda de pessoas especiais. Portanto, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, alicerce da minha vida, pelo constante apoio e incentivo para seguir meus objetivos, por acreditarem em meu potencial e por me ensinarem que nunca devo desistir dos meus sonhos. Sem vocês, nada disto seria possível.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza, por ter aceitado o desafio de desenvolver este trabalho. Muito obrigada pelo seu exemplo de caráter e de responsabilidade.

Ao Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez, pelo seu importante papel na minha vida acadêmica desde a graduação, pelo companheirismo ao longo de todos esses anos e por ter me apoiado e confiado a responsabilidade da execução deste projeto. Graças ao seu apoio, tive a oportunidade de encontrar a linha de pesquisa pela qual me apaixonei e que pretendo dar continuidade. Muito obrigada!

À Prof.^a Dr.^a Christine Lamenha Luna Finkler e ao Prof. Leandro Finkler pelo completo apoio e pela permissão para usar as dependências do Laboratório de Bioprocessos, no Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE). Sou muito grata também à professora Christine por sua atenção e dedicação, por todo suporte durante os experimentos, pelas enriquecedoras trocas de ideias e por todas as oportunidades que me tem proporcionado desde que nos conhecemos. Admiro muito seu caráter, sua ética, sua busca por excelência naquilo que faz, e tão somente espero conseguir cultivar esses mesmos valores ao longo de minha jornada enquanto pesquisadora. Muito obrigada por tudo!

À Prof.^a Dr.^a Idjane Santana de Oliveira (CAV/UFPE) pelas valiosas sugestões durante a otimização dos ensaios.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia, pela colaboração com o projeto e pela permissão em desenvolver as etapas de Biologia Molecular nas dependências do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos (CAV/UFPE).

Aos técnicos do CAV/UFPE pela imensa assistência durante os trabalhos. Agradeço à Michelle Oliveira pela paciência durante meu treinamento em

Microbiologia e pelo acompanhamento nas etapas iniciais de isolamento dos micro-organismos marinhos. Agradeço também ao Anderson Santos pelos enriquecedores *insights* em química que muito me ajudaram durante os experimentos. Também sou profundamente grata ao Gabriel Locatelli, por me ter educado nas práticas de laboratório, por suas valiosas contribuições para otimização dos protocolos, pela paciência em responder as minhas muitas dúvidas, pela amizade e por ter facilitado tanto minha vida. Não teria chegado tão longe sem vocês!

Aos colegas Felipe Campos e Isabel Lima pela valiosa ajuda durante os experimentos de Genética. Agradeço de coração por terem dedicado do seu tempo e atenção para me auxiliar, compartilhando comigo seus conhecimentos.

Aos jangadeiros e agentes ambientais da praia de Porto de Galinhas, bem como aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Antozoários (GPA/UFPE-UFRPE) pela ajuda durante as coletas de material biológico.

Aos professores e demais funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UFPE pela valiosa contribuição em nossa formação. Agradeço em especial à secretaria do PPGCF nas pessoas de Nerilin Trajano e Rilvan Guedes, nossos anjos da guarda, pela sua imensa paciência, disposição em ajudar e por terem cuidado de nós com tanto zelo. Sem vocês, teria sido muito mais difícil. Muito obrigada!

Aos meus colegas de classe, em especial à Iasmine Alves, pelo companheirismo e por toda compreensão e ajuda durante as disciplinas. Seu caráter e dedicação são qualidades que admiro muito. MUITÍSSIMO obrigada!

Meus sinceros agradecimentos aos membros da banca por seu tempo, por sua disponibilidade e pelas valiosas considerações para o presente trabalho.

À Diretoria de Inovação e Empreendedorismo (DINE/UFPE), na pessoa de Ana Carolina Padrão, pela imensa ajuda durante os trâmites burocráticos para o depósito do pedido de patente.

Não poderia deixar de agradecer também à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de estudos durante o doutorado.

A todos, muito obrigada!

Para mim, esta foi, entre todas as maravilhas que descobri na natureza, a mais maravilhosa de todas; e devo dizer que, de minha parte, visão mais agradável ainda não me veio aos olhos que esta de tantos milhares de criaturas vivas em uma pequena gota de água [...] (VAN LEEUWENHOEK, 1676, p. 115, tradução nossa).

RESUMO

Palythoa caribaeorum (baba-de-boi) é um cnidário marinho que secreta um muco viscoso o qual apresenta propriedades farmacológicas e abriga uma série de bactérias com potencial de aplicação biotecnológica. No presente trabalho, objetivou-se obtenção desses micro-organismos associados ao muco de populações do zoantídeo oriundas da praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco, para fins de prospecção de produtos naturais. Foram isoladas 281 bactérias das quais 55 cepas se mantiveram viáveis após o subcultivo e preservação. A identificação dos isolados foi realizada a partir do sequenciamento dos genes 16S rDNA e rpoB, resultando na obtenção de 18 espécies pertencentes aos filos Firmicutes (37 isolados, 67%), Actinobacteria (11 isolados, 20%), Proteobacteria (5 isolados, 9%) e Bacteroidetes (2 isolados, 4%). *Exiguobacterium aurantiacum* correspondeu à espécie mais abundante com 9 isolados, enquanto o gênero *Bacillus* se apresentou como o mais diverso, totalizando 19 isolados distribuídos em 8 espécies distintas. Os isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados para investigação do potencial de produção de 8 enzimas em meio sólido. Todas as cepas produziram pelo menos 4 das enzimas investigadas, com gelatinase sendo a mais frequente (19 isolados), seguida por esterase (18), caseinase (17), amilase (12), poligalacturonase (12), pectato liase (12), celulase (11) e lipase (11). Os isolados *B. thuringiensis* BCLTHR-01 e *B. subtilis* BCLSUB-02, 03 e 04 foram os melhores produtores enzimáticos, com resultados positivos em todos os ensaios. A cepa BCLTHR-01 também foi investigada quanto ao potencial biolarvicida contra *Aedes aegypti*. Para produção das toxinas, foi desenvolvido um processo fermentativo em biorreator operando em batelada com um meio de cultura desprovido de carboidratos como fonte de carbono. A biomassa tóxica concentrada (10^9 UFC/mL) obtida após 48h de fermentação mostrou atividade biológica com valores de CL₅₀ de 0,849 ppm (intervalo de 0,792 a 0,900 ppm) e de CL₉₀ de 1,285 ppm (intervalo de 1,190 a 1,434 ppm), comprovando o potencial de aplicação deste isolado para o controle do vetor. As bactérias marinhas associadas a *P. caribaeorum* são potencialmente excelentes fontes de metabólitos bioativos. A presença de espécies capazes de degradar hidrocarbonetos, fixar nitrogênio, metabolizar enxofre e produzir enzimas e toxinas com diversas propriedades sugere que o zoantídeo se beneficia através da assimilação de compostos complementares ao seu metabolismo e através da aquisição de um mecanismo adicional de defesa contra patógenos. A complexidade do ambiente marinho induz à adaptação dos micro-organismos, resultando na produção de uma diversidade de moléculas com propriedades únicas que lhes permitem suportar as condições severas dos processos industriais, tornando-as interessantes objetos para aplicação industrial e biotecnológica.

Palavras-chave: Microbiologia marinha. Atividade enzimática. Toxinas bacterianas. Biotecnologia marinha. Anthozoa. Controle biológico. Taxonomia molecular.

ABSTRACT

Palythoa caribaeorum (baba-de-boi) is a marine cnidarian that secretes a viscous mucus which presents pharmacological properties and harbors several bacteria with potential for biotechnological application. In the present work, we aimed to obtain these microorganisms associated with the mucus of zoanthid populations from the beach of Porto de Galinhas, south coast of Pernambuco, to prospect for natural products. 281 bacteria were isolated, of which 55 strains remained viable after subculture and preservation. The identification of the isolates was done by sequencing the 16S rDNA and rpoB genes, resulting in 18 species belonging to the Firmicutes (37 isolates, 67%), Actinobacteria (11 isolates, 20%), Proteobacteria (5 isolates, 9 %) and Bacteroidetes (2 isolates, 4%). *Exiguobacterium aurantiacum* corresponded to the most abundant species with 9 isolates, while the genus *Bacillus* was the most diverse, totaling 19 isolates distributed in 8 different species. The isolates of *Bacillus* spp. were selected to investigate the potential to produce 8 enzymes in solid medium. All strains produced at least 4 of the investigated enzymes, with gelatinase being the most frequent (19 isolates), followed by esterase (18), caseinase (17), amylase (12), polygalacturonase (12), pectate lyase (12), cellulase (11) and lipase (11). The isolates *B. thuringiensis* BCLTHR-01 and *B. subtilis* BCLSUB-02, 03 and 04 were the best enzymatic producers, displaying positive results in all the assays. The strain BCLTHR-01 was also investigated for its biolarvicidal potential against *Aedes aegypti*. To produce the toxins, a fermentation process was developed in bioreactor batching with a culture medium devoid of carbohydrates as carbon source. The concentrated toxic biomass (10^9 CFU/mL) obtained after 48h of fermentation showed biological activity with LC₅₀ value of 0.849 ppm (range of 0.792 to 0.900 ppm) and CL₉₀ value of 1.285 ppm (range of 1.190 to 1.434 ppm), proving the application potential of this isolate for vector control. Marine bacteria associated with *P. caribaeorum* are potentially excellent sources of bioactive metabolites. The presence of species capable of degrading hydrocarbons, fixing nitrogen, metabolizing sulfur and producing enzymes and toxins with different properties suggests that the zoanthide benefits through the assimilation of compounds complementary to its metabolism and through the acquisition of an additional mechanism of defense against pathogens. The complexity of the marine environment induces the adaptation of microorganisms, resulting in the production of a diversity of molecules with unique properties that allow them to withstand the harsh conditions of industrial processes, making them interesting objects for industrial and biotechnological application.

Keywords: Marine microbiology. Enzymatic activity. Bacterial toxins. Marine biotechnology. Anthozoa. Biological control. Molecular taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Colônias de <i>Palythoa caribaeorum</i> do litoral de Pernambuco.....	17
Figura 2 – Fluxograma da metodologia empregada.....	26
Figura 3 – Vista aérea dos recifes da praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco.....	27
Figura 4 – Área de estudo localizada na praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco.....	27
Figura 5 – Biorreator de bancada utilizado para os cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> BCLTHR-01 realizados no Laboratório de Bioprocessos - CAV/UFPE.....	35
Figura 6 – Colônias de bactérias marinhas isoladas do muco de <i>Palythoa caribaeorum</i>	41
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico extraído e dos marcadores moleculares amplificados para os isolados marinhos bacterianos.....	43
Figura 8 – Composição da comunidade bacteriana do muco de <i>Palythoa caribaeorum</i> ao nível de filo	43
Figura 9 – Triagem enzimática de <i>Bacillus</i> spp. em meio sólido	50
Figura 10 – Interpretação dos resultados de detecção de atividade enzimática em meio sólido	50
Figura 11 – Frequência de enzimas produzidas pelas cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	53
Figura 12 – Valores médios da concentração de células totais, de esporos viáveis e de proteínas para dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator	56
Figura 13 – Fotomicrografias de amostras do cultivo de BCLTHR-01 em meio MBS após coloração com Azul de Coomassie.....	56
Figura 14 – Variação de pH e de oxigênio dissolvido (OD) para dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências iniciadoras (primers) utilizadas para amplificação dos genes 16S rRNA e rpoB dos isolados marinhos	31
Tabela 2 – Espécies e frequência das bactérias marinhas isoladas do muco de <i>Palythoa caribaeorum</i>	44
Tabela 3 – Frequência de produção enzimática para <i>Bacillus</i> spp.	51
Tabela 4 – Atividade enzimática dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. em meio sólido	52
Tabela 5 – Valores médios de contagem de células totais e esporos e concentração de proteínas para amostras de dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator	57
Tabela 6 – Atividade biológica da amostra de 48h da biomassa concentrada de BCLTHR-01 e do padrão IPS-82 contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	14
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1	ASSOCIAÇÕES ENTRE INVERTEBRADOS E BACTÉRIAS MARINHAS ..	16
3.2	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS MARINHAS	18
3.2.1	Agentes terapêuticos	20
3.2.2	Uso de toxinas de origem bacteriana na farmacologia marinha	20
3.2.3	Controle biológico de vetores	20
3.2.4	Biossurfactantes	22
3.2.5	Enzimas	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
4.2	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS MARINHAS HETEROTRÓFICAS DO MUCO DE <i>P. caribaeorum</i>	28
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	28
4.3.1	Características microscópicas das cepas isoladas.....	29
4.3.2	Identificação molecular dos isolados bacterianos	29
4.3.2.1	<i>Extração do DNA genômico bacteriano</i>	<i>29</i>
4.3.2.2	<i>Amplificação dos genes 16S rRNA e rpoB e sequenciamento</i>	<i>30</i>
4.4	PRESERVAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	31
4.4.1	Armazenamento em glicerol	32
4.4.2	Liofilização dos isolados marinhos	32
4.4.2.1	<i>Determinação da concentração das amostras liofilizadas</i>	<i>32</i>
4.5	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM SUBSTRATO SÓLIDO	33
4.6	ATIVIDADE BIOLARVICIDA DE ISOLADO DE <i>Bacillus</i>	34
4.6.1	Cultivo do isolado <i>Bacillus thuringiensis</i> BCLTHR-01 em biorreator.....	34
4.6.2	Monitoramento do processo fermentativo de BCLTHR-01	35
4.6.2.1	<i>Observação da produção de toxinas e esporos de BCLTHR-01</i>	<i>35</i>
4.6.2.2	<i>Determinação da concentração de células do cultivo de BCLTHR-01.....</i>	<i>36</i>
4.6.2.3	<i>Extração e quantificação de proteínas totais do cultivo de BCLTHR-01.....</i>	<i>36</i>

4.6.3	Avaliação da atividade larvica contra <i>Aedes aegypti</i>	37
4.6.3.1	Obtenção da biomassa de BCLTHR-01.....	37
4.6.3.2	Bioensaios	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	ISOLAMENTO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS BACTÉRIAS MARINHAS ASSOCIADAS AO MUCO DE <i>P. caribaeorum</i>	39
5.2	ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA HETEROTRÓFICA ASSOCIADA AO MUCO DE <i>P. caribaeorum</i>	42
5.2.1	Firmicutes: <i>Bacillus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>	45
5.2.2	Actinobacteria: <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i>	46
5.2.3	Proteobacteria: <i>Vibrio</i>	47
5.2.4	Bacteroidetes: <i>Tenacibaculum mesophilum</i>	48
5.3	PERFIL ENZIMÁTICO DE CEPAS DE <i>Bacillus</i> spp. ASSOCIADAS AO MUCO DE <i>P. caribaeorum</i>	48
5.4	POTENCIAL DO ISOLADO BCLTHR-01 COMO BIOLARVICIDA CONTRA VETORES CULICÍDEOS.....	54
5.4.1	Produção da biomassa concentrada de BCLTHR-01 em biorreator	55
5.4.2	Toxicidade de BCLTHR-01 para larvas de <i>A. aegypti</i>	59
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A – Composição dos meios de cultura utilizados	81
	APÊNDICE B – Métodos de revelação para atividade enzimática	82
	APÊNDICE C – Aspectos morfológicos dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	83
	ANEXO A – Depósito do pedido de patente (INPI: BR 1020170182495).	85

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes recifais correspondem a uma das regiões mais ricas do planeta. Esses ecossistemas funcionam como verdadeiras “ilhas de biodiversidade” nos oceanos, concentrando não apenas uma grande diversidade de espécies distribuídas nos mais variados filos, como também uma gama de metabólitos de grande interesse biotecnológico devido à ampla variedade de suas estruturas químicas (BLUNT et al., 2014) e atividades biológicas diversas e frequentemente potentes (FENNER; GERWICK, 2014).

Dentre os organismos encontrados nesse ambiente, destacam-se os invertebrados marinhos, a exemplo dos cnidários, conhecidos pela produção de potentes toxinas (TURK; KEM, 2009) e de moléculas com potencial farmacológico e biotecnológico (ROCHA et al., 2011). Por muitos anos, esses organismos recifais foram intensamente explorados e sua coleta indiscriminada pôs em risco de extinção populações desses animais em várias partes do mundo. Felizmente, com o passar do tempo, foram desenvolvidos métodos para obtenção desses compostos em laboratório, evitando o desaparecimento dessas espécies.

Através de uma série de estudos envolvendo a biossíntese dos compostos, foi verificado que muitas das moléculas bioativas inicialmente atribuídas a esses animais eram, na realidade, produzidas ou metabolizadas por seus micro-organismos associados (GERWICK; FENNER, 2013; HAYGOOD et al., 1999; PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002). A possibilidade de manipulação das culturas microbianas em laboratório e a capacidade de otimização das condições para produção dos metabólitos bioativos levaram a uma rápida expansão do campo de estudo voltado à prospecção de produtos naturais microbianos, que permitiu o desenvolvimento de processos econômicos para obtenção de produtos em larga escala, contribuindo, ao mesmo tempo, para a preservação da integridade dos ecossistemas marinhos.

Nos recifes de arenito do litoral sul de Pernambuco, um dos organismos mais abundantes é o cnidário bentônico *Palythoa caribaeorum*, o qual participa de intensas interações ecológicas e corresponde a um dos principais moduladores das comunidades recifais locais. Relatos de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes apresentadas pelas colônias desse organismo estimulou a realização de uma série de estudos farmacológicos e toxicológicos no Estado (COSTA, 2013; MELO et al., 2012; NOBRE; MODESTO, 2008; SOARES et al., 2006;

VASCONCELOS, 2011).

Como parte dos esforços para aprofundar o conhecimento do potencial biotecnológico das populações locais deste zoantídeo, Campos iniciou em 2011 as investigações com a microbiota associada ao muco desse cnidário, utilizando-se da identificação molecular para estudar a composição da comunidade bacteriana cultivável.

Uma vez que o trabalho de Campos focou apenas no conhecimento da microbiota, foi de nosso interesse dar continuidade às investigações para avaliar o potencial biotecnológico dessas bactérias. Já foi comprovado na literatura especializada que algumas cepas pertencentes às várias espécies encontradas por esse autor têm sido empregadas como remediadores ambientais, produtores de antibióticos, de enzimas, de pigmentos detentores de diversas atividades farmacológicas, dentre outras aplicações.

Dessa forma, um dos principais objetivos do presente trabalho foi a obtenção e a preservação de novas linhagens de bactérias marinhas heterotróficas cultiváveis que sejam de interesse para processos industriais e biotecnológicos, permitindo a obtenção de matéria-prima de forma sustentável para a geração de produtos comerciais e terapêuticos que venham a contribuir com a economia e a saúde no Estado.

2 OBJETIVO GERAL

Conhecer a diversidade e investigar o potencial biotecnológico da comunidade bacteriana heterotrófica cultivável associada ao muco de populações de *P. caribaeorum* provenientes da praia de Porto de Galinhas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar bactérias obtidas a partir do muco de colônias sadias de *P. caribaeorum*;
- Realizar a preservação e manutenção dos isolados;
- Identificar geneticamente os isolados através do sequenciamento de marcadores moleculares específicos;
- Investigar a capacidade de produção de enzimas em meio sólido por isolados de *Bacillus* spp.;
- Produzir endotoxinas de um isolado de *Bacillus* através de fermentação em biorreator;
- Avaliar o potencial biolarvicida dos caldos fermentados obtidos para controle biológico do vetor *Aedes aegypti*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O ambiente marinho, detentor de 97,5% de toda a água do planeta, corresponde a mais de 70% da superfície da Terra (LOZADA; DIONISI, 2015) e comporta cerca de 80% dos organismos vivos, os quais ocupam todos os espaços desse ambiente, sendo encontrados na interface ar-água, na coluna d'água ou no fundo marinho, podendo também utilizar outros organismos como substrato (VOLBEHR; RACHOR, 1997).

A maior parte da biodiversidade marinha encontra-se no ambiente recifal (PRIMACK, 2010), sobretudo na região bentônica (do grego βένθος, *benthos*: fundo), e varia de acordo com o tipo de substrato, que pode ser inconsolidado (ex. fundos lamosos, areia, cascalho) ou consolidado (recifes, costões rochosos e estruturas artificiais como naufrágios, pilares de píeres, colunas das plataformas de petróleo, dentre outros) (COUTINHO, 2002; GOMES; PAIVA; SUMIDA, 2002).

A escassez de substratos consolidados no ambiente marinho, que correspondem a menos de 2% do fundo oceânico, forma as chamadas “ilhas de biodiversidade”, caracterizadas pela alta densidade de organismos em um espaço reduzido. Esta alta concentração de organismos promove um grande número de interações ecológicas que culminam na necessidade de desenvolvimento de estratégias para defesa contra patógenos e predadores, além de competição por espaço, luz e nutrientes (HARPER et al., 2001; MARTINS et al., 2014).

Esses mecanismos adaptativos são ainda mais cruciais ao se considerar os invertebrados bentônicos ditos sésseis ou fixos que, devido à incapacidade de locomoção, não podem buscar novos ambientes quando as condições se tornam desfavoráveis (ex.: presença de predadores, substâncias tóxicas no meio, etc.). Além disso, esses organismos não apresentam estruturas de defesa aparentes e são desprovidos de um sistema imune propriamente dito (IWANAGA; LEE, 2005), baseando sua defesa na produção de compostos bioativos (PAWLIK, 1993) ou na obtenção destes a partir da dieta (FAULKNER; GHISELIN, 1983) ou de micro-organismos associados (GERWICK; FENNER, 2013; KOKKE et al., 1984).

As interações ecológicas em invertebrados marinhos são mediadas, em grande parte, por metabólitos secundários, substâncias bioativas únicas e diversificadas (BLUNT et al., 2014; FENNER; GERWICK, 2014) que são conhecidas por suas potentes atividades, provavelmente relacionadas à necessidade de superar a diluição

desses compostos na água do mar (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010). Essas moléculas representam uma fonte virtualmente ilimitada de novos compostos e têm sido empregadas nos mais variados setores da indústria, como: pesquisa biomédica e desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos (BLUNT et al., 2014; FENNER; GERWICK, 2014; HAEFNER, 2003), ferramentas moleculares (CHUDAKOV et al., 2010; DE FARIAS, 2008), produtos nutracêuticos (KIM, 2012), indústria náutica (ALBRIZIO et al., 1995; ALMEIDA et al., 2014; KELLY et al., 2003), medicina, odontologia e cosmética (DAMIEN; REVELL, 2004; LOOK et al., 1986), dentre outros.

3.1 ASSOCIAÇÕES ENTRE INVERTEBRADOS E BACTÉRIAS MARINHAS

Muitos invertebrados marinhos bentônicos são conhecidos por apresentar uma estreita relação com bactérias, que podem ser epibiontes, entéricas ou encontradas intracelularmente (BONAR; WEINER; COLWELL, 1986; WAHL et al., 2012). Essas interações resultam em um complexo ecossistema, conhecido como holobionte ou metaorganismo, no qual os micro-organismos associados participam de complexas interações sinérgicas e inibitórias tanto entre si, quanto entre eles e seus hospedeiros (QUEVRAIN; DOMART-COULON; BOURGUET-KONDRACKI, 2014). As bactérias encontram nesses invertebrados proteção e fontes de carbono e nitrogênio, fornecendo em troca metabólitos bioativos (DEBBAB et al., 2010) geralmente complexos como um resultado do processo coevolutivo (SCHMIDT, 2005), e que beneficiam a saúde do hospedeiro, contribuindo também para o aumento da disponibilidade de nutrientes (ARMSTRONG et al., 2001; RESHEF et al., 2006).

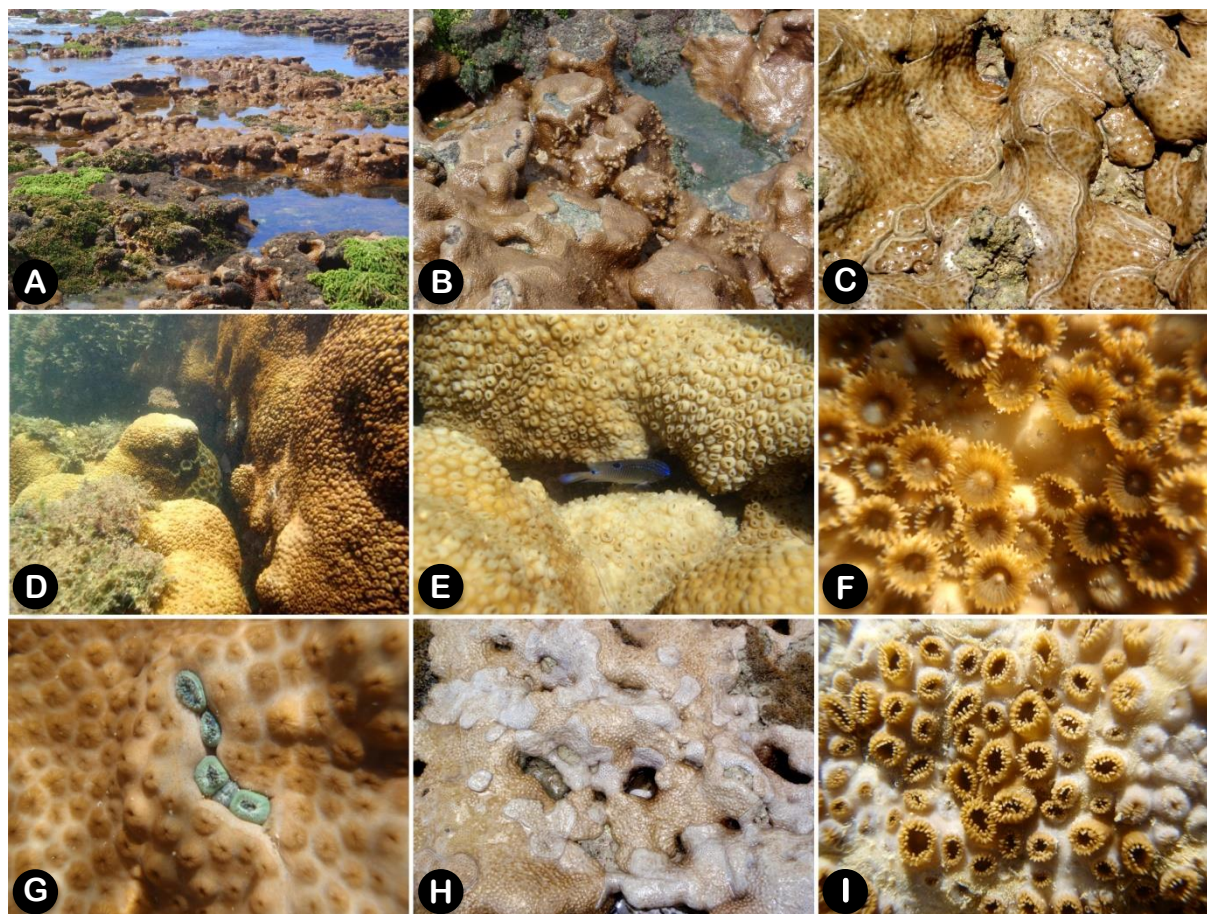
Um dos principais grupos que apresenta associações com bactérias marinhas são os cnidários, um filo de invertebrados com grande variedade de formas, tamanhos e cores, que incluem corais, anêmonas-do-mar, águas-vivas, caravelas-portuguesas, hidrozoários e leques-do-mar. A classe Anthozoa corresponde aos cnidários que apresentam apenas a forma de pólipos, podendo ser solitários ou coloniais. Estes englobam a ordem Scleractinia, antozoários coloniais conhecidos como “corais moles” (devido à ausência do esqueleto de carbonato de cálcio presente nos corais verdadeiros) que geralmente formam grandes colônias incrustadas sobre formações rochosas.

Dentre os zoantídeos mais abundantes na costa brasileira encontra-se a

espécie *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti, 1860). Trata-se de um organismo colonial exclusivamente marinho, cujos pólipos medem cerca de 5 a 10 mm de diâmetro por 1 cm de espessura (HAYWICK; MUELLER, 1997), com coloração entre amarelo e marrom (Figura 1).

Popularmente, esse organismo é conhecido como “baba-de-boi” devido à secreção de um muco bastante viscoso, constituído por proteínas, lipídios, polissacarídeos, aminoácidos e minerais (BROWN; BYTHELL, 2005; MEIKLE; RICHARDS; YELLOWLEES, 1988; NOBRE; MODESTO, 2008; VASCONCELOS, 2011). Sua principal função é proteger a colônia contra raios UV, dessecação, infecção (BROWN; BYTHELL, 2005; SANTOS et al., 2015), servindo também como substrato para o crescimento de micro-organismos (CAMPOS, 2011; CAMPOS et al., 2015; CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; RABELO, 2012).

Figura 1 – Colônias de *Palythoa caribaeorum* do litoral de Pernambuco



Legenda: (A,B,C) Colônias saudáveis expostas durante a maré baixa; (D,E,F) Aspecto das colônias submersas; (F) Detalhe dos pólipos abertos; (G) Detalhe dos pólipos retraídos; (H,I) Colônias em processo de branqueamento.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2014).

A comunidade microbiana associada a *P. caribaeorum* é geralmente representada por espécies dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus* e *Paracoccus*, sendo o filo Gammaproteobacteria quase sempre o mais comum (CAMPOS, 2011; CAMPOS et al., 2015; CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; RABELO, 2012).

Além destes, há ainda uma relação de simbiose com zooxantelas do gênero *Symbiodinium* (RABELO et al., 2014) que, ao saírem do zoantídeo, provocam um processo chamado branqueamento (KEMP et al., 2006), referente à perda de coloração dos seus tecidos (DOUGLAS, 2003) (Figura 1 H,I).

Outra manifestação patológica encontrada nesses organismos inclui a infecção por micro-organismos patogênicos (possivelmente *Vibrio*) que promovem a necrose de tecidos, geralmente em um padrão circular, ocasionando a mortalidade parcial das colônias. O tecido lesionado apresenta uma progressão para coloração pálida, com presença de pólipos inchados, seguida da observação de estruturas remanescentes semelhantes a espículas, e finalmente a presença de uma massa enegrecida e do substrato nu no meio da lesão (ACOSTA, 2001).

3.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS MARINHAS

A busca por produtos naturais de origem marinha tem fornecido um grande número de importantes moléculas com potencial biotecnológico, as quais foram, em sua maioria, atribuídas inicialmente a invertebrados marinhos de regiões tropicais e de águas rasas (GERWICK; FENNER, 2013).

Entretanto, com o avanço das técnicas de cultivo e desenvolvimento de estratégias moleculares para identificação de micro-organismos, de produtos naturais e de vias biossintéticas, foi descoberto que muitos desses compostos eram na verdade oriundos das bactérias marinhas associadas a esses organismos (GERWICK; FENNER, 2013; GIDDINGS; NEWMAN, 2013; GULDER; MOORE, 2009; IMHOFF; LABES; WIESE, 2011; PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010; WAHL et al., 2012; WATERS et al., 2010). Isso já foi observado na biossíntese de substâncias como: pseudopterosinas, topsentinas, scitoneminas e manoalida (anti-inflamatórias), briostatina, discodermolida, eleuterobina e sarcodictina (anticancerígenas) e marinona (antibiótica), dentre outras (BOOPATHY; KATHIRESAN, 2010).

A origem bacteriana dos compostos bioativos encontrados em invertebrados se

manifesta como uma vantagem do ponto de vista da obtenção de insumos em larga escala para a indústria. A fermentação microbiana consiste em um processo relativamente fácil, através do qual são fornecidas as moléculas de interesse de forma mais econômica e sustentável quando comparado com a obtenção a partir de macro-organismos (WATERS et al., 2010). Os invertebrados apresentam crescimento mais lento, requerem condições nutricionais e ambientais mais elaboradas (quando passíveis de cultivo em laboratório) e geralmente precisam ser sacrificados durante o processo de obtenção dos compostos bioativos (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010). Esses dados evidenciam a importância de se explorar fontes microbianas renováveis para a descoberta de novos produtos naturais marinhos.

Apesar de todo seu potencial, o uso de bactérias na bioprospecção de produtos naturais apresenta algumas limitações, como a falta de técnicas eficientes para o cultivo das cepas em laboratório, processos de purificação laboriosos e falta de desreplicação¹ (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010). As técnicas de cultivo disponíveis permitem isolar apenas uma pequena porção da ampla variedade de micro-organismos, não refletindo os consórcios que eles formam no ambiente marinho, e que estão diretamente ligados à síntese das biomoléculas (JOINT; MÜHLING; QUERELLOU, 2010; PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010).

No entanto, essas limitações estão sendo superadas devido ao melhoramento contínuo de técnicas de cultivo que levam em consideração as relações ecológicas únicas no ambiente marinho, além do emprego de análises metagenômica, metabolômica e transcriptômica, aliadas ao desenvolvimento de novas ferramentas analíticas sensíveis para elucidação estrutural (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010).

De forma geral, os metabólitos oriundos de bactérias marinhas têm sido amplamente explorados para uma série de aplicações biotecnológicas, sendo empregados nas ciências da saúde (antimicrobianos, agentes terapêuticos para oncologia, moléculas citotóxicas), na produção de enzimas voltadas para síntese total de compostos ou na química médica, na produção de biopolímeros e plásticos degradáveis, pigmentos, moléculas coesivas (“cimentos marinhos”) e surfactantes, como remediadores de ambientes poluídos, como probióticos (LUNA, 2015), etc.

¹ O termo desreplicação se refere à busca de substâncias estruturalmente inéditas em que são empregadas técnicas cromatográficas sensíveis para evitar o isolamento de substâncias já conhecidas.

3.2.1 Agentes terapêuticos

No campo das ciências da saúde, diversos metabólitos bioativos têm demonstrado um grande potencial como agentes antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos, antiprotozoários, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais e citotóxicos, antioxidantes, além de agir sobre os sistemas imune e nervoso (BHATNAGAR; KIM, 2010; DEBBAB et al., 2010; LUNA, 2015; MARTINS et al., 2014; MAYER et al., 2013; VELHO-PEREIRA; PARVATKAR; FURTADO, 2015).

Apesar do grande número de metabólitos bioativos descobertos a cada ano para micro-organismos marinhos, apenas uma pequena parcela encontra-se atualmente em fase de testes clínicos, principalmente voltados ao tratamento de diversos tipos de câncer (MAYER, 2017). Em sua maioria, os compostos são oriundos de cianobactérias/moluscos (19 compostos incluindo uma droga aprovada pelo *Food and Drug Administration*, FDA – Brentuximab vedotin (SGN-35)/Adcetris®), sendo listados também um análogo semissintético de um composto oriundo de *Aspergillus ustus* (Plinabulin, NPI-2358 em fase III) (KORNIENKO et al., 2015) bem como um metabólito oriundo da actinobactéria *Salinispora tropica* (Marizomib/Salinosporamide A, NPI-0052 em fase I) (FELING et al., 2003).

3.2.2 Uso de toxinas de origem bacteriana na farmacologia marinha

Em uma abordagem diferenciada dentro da farmacologia marinha, tem-se avaliado o potencial emprego de toxinas em estudos neurofisiológicos e neurofarmacológicos (BOOPATHY; KATHIRESAN, 2010; WATERS et al., 2010), sobretudo no controle de dores crônicas relacionadas ao câncer (NEWMAN; CRAGG, 2014), a exemplo da tetrodoxina (Tectin®), que se encontra em fase III dos ensaios clínicos (MAGARLAMOV; MELNIKOVA; CHERNYSHEV, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2014).

3.2.3 Controle biológico de vetores

A expressão “controle biológico” foi empregada pela primeira vez por Harry S. Smith em 1919 para indicar o uso de inimigos naturais no controle de insetos pragas em lavouras. Posteriormente, o termo passou a ser utilizado para referenciar todos os

métodos de controle baseados no uso de organismos vivos (ou de substâncias por eles produzidas) como alternativa ao uso de produtos químicos que, além de promover o surgimento de linhagens resistentes, também são prejudiciais ao meio ambiente devido ao seu amplo espectro de ação (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

O controle desses vetores tem sido realizado por uso de bioinseticidas à base de toxinas produzidas por diferentes micro-organismos (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000; OKAFOR, 2007), como representantes dos gêneros *Bacillus* (MAEDA et al., 2000), *Pseudomonas* (NABAR; LOKEGAONKAR, 2015), *Streptomyces* (XIONG; LI; KONG, 2004) e *Enterobacter* (POOPATHI; AHANGAR; et al., 2014), dentre outros.

No processo de triagem de biolarvicidas, os produtos são inicialmente testados em escala laboratorial de modo a se comprovar sua eficácia no controle de vetores específicos com base nos valores obtidos para os testes de concentração letal capaz de eliminar 50% da população (CL₅₀). Os larvicidas que se mostram promissores são então encaminhados à uma segunda fase de testes de pequena escala em campo (locais de reprodução naturais ou campo simulado), em que são testadas diferentes concentrações do produto com base nos resultados dos testes laboratoriais para determinação da concentração letal capaz de eliminar 90% da população (CL₉₀). Por fim, o potencial dos produtos é validado em ensaios de campo em larga escala contra populações naturais do vetor em seus locais naturais de reprodução (WHO, 2005).

Uma das pragas que tem ganhado destaque no cenário epidemiológico mundial é o mosquito *A. aegypti* (Diptera: Culicidae), conhecido por ser o vetor de arbovírus que causam Dengue, Chikungunya e Zika (GRARD et al., 2014). Trata-se de uma espécie holometabólica predominantemente urbana, com ciclo de vida composto pelas fases de ovo, larva (L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e mosquito adulto, e que deposita seus ovos separadamente na parede interna de objetos localizados próximos à superfície de água limpa (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Ao entrarem em contato com a água acumulada no período de chuvas, os ovos eclodem e liberam as larvas (BEATY; MARQUARDT, 1996). Uma vez que os criadouros (ex.: garrafas vazias, pneus, caixas d'água descobertas, vasos de plantas, bromélias, troncos de árvores) são difíceis de serem completamente eliminados do ambiente por questões naturais ou problemas de saneamento, os mesmos tornaram-se alvos para a aplicação de inseticidas (ZARA et al., 2016).

Uma das alternativas mais eficientes para o controle biológico de populações desse vetor é o uso de bioinseticidas à base principalmente de linhagens de *B. thuringiensis*, uma espécie de bactéria esporulante capaz de produzir proteínas tóxicas na forma de cristais parasporais (USTA, 2013) altamente específicas ao inseto alvo, completamente biodegradáveis e não apresentam danos a seres humanos, vertebrados ou plantas. Uma vez ingeridas por larvas de insetos específicos, as toxinas são ativadas no intestino e passam a promover a necrose das células epiteliais, levando à morte (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Vários esforços têm sido concentrados para o desenvolvimento de produtos de bacilos para o controle de nematoides, lepidópteros, coleópteros e dípteros (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007), objetivando-se a obtenção de produtos com custo reduzido e com alto rendimento. Exemplos de produtos já comercializados no Brasil incluem o DengueTech® à base de *B. thuringiensis* para o controle de *Aedes aegypti* e o Vectolex® WG, à base de *B. sphaericus* para o controle de *Culex quinquefasciatus*.

O potencial larvicida de bactérias marinhas já foi descrito para espécies de actinobactérias (BALAKRISHNAN; SANTHANAM; SRINIVASAN, 2017) e de *Bacillus* spp. (BALAKRISHNAN; INDIRA; SRINIVASAN, 2015; GEETHA et al., 2007; MANI et al., 2015; POOPATHI; MANI; et al., 2014), isoladas sobretudo de ambientes estuarinos e manguezais.

3.2.4 Biossurfactantes

Outro grupo de metabólitos produzidos por micro-organismos marinhos são os biossurfactantes, moléculas anfipáticas com propriedades tensoativas utilizadas em diversos processos industriais envolvendo emulsificação, detergência, solubilização e redução da tensão superficial, etc. (NITSCHKE; PASTORE, 2002; WU; LU, 2015).

As principais vantagens em comparação aos surfactantes químicos incluem baixa toxicidade, alta compatibilidade ambiental (biodegradáveis) e melhores propriedades espumantes. Além disso, algumas dessas moléculas apresentam atividades biológicas (ex.: antimicrobiana, antioxidante) e são ativas em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Dentre os micro-organismos produtores, podem ser citados representantes dos gêneros *Alcanivorax*, *Alcaligenes* e *Arthrobacter* (glicolipídeos), *Myroides* (lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos) e *Pseudomonas* (biossurfactantes

poliméricos) (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

3.2.5 Enzimas

As enzimas também consistem em um grupo de metabólitos bastante investigados em bactérias marinhas, sobretudo aquelas detentoras de propriedades diversificadas e pouco usuais, como tolerância a condições extremas de salinidade, temperatura, pH e presença de solventes orgânicos (DEBNATH; PAUL; BISEN, 2007; SANA, 2015).

O principal grupo estudado são as proteases, que correspondem a mais de 60% do mercado global de enzimas e são utilizadas no processamento de alimentos, na indústria farmacêutica, de detergentes e de couro, na pesquisa biotecnológica e em remediação e manejo de dejetos industriais (MUFFLER et al., 2015; SANA, 2015). A gelatinase, por exemplo, é um tipo de metaloprotease extracelular que tem a capacidade de hidrolisar a gelatina em seus subcompostos, como polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos, permitindo que estes possam atravessar a membrana celular e ser utilizados pelo organismo. Atualmente tem sido investigada como alvo para desenvolvimento de drogas, devido ao seu papel potencial na degradação de tecido conjuntivo associado à metástase tumoral (BALAN et al., 2012). As proteases foram inicialmente isoladas de *Bacillus licheniformis* em 1960 e posteriormente encontradas em *Psychrobacter* em 1972 e, desde então, essas moléculas vêm sendo obtidas de uma série de micro-organismos diversos (ZHANG; KIM, 2010).

As lipases também são um grupo de enzimas sintetizadas por bactérias marinhas que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monogliceróis e gliceróis, sendo eficientes em reações de esterificação, transesterificação e aminólise (ZHANG; KIM, 2010). Devido à sua alta estabilidade em presença de solventes orgânicos e ampla especificidade ao substrato, essas moléculas têm sido utilizadas na produção de detergentes, papeis, cosméticos, saborizantes alimentares e em sínteses orgânicas (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012). Essas enzimas podem ser aplicadas em vários processos como facilitadoras no processo digestivo, auxiliares no tratamento de perturbações gastrointestinais, tratamento de tumores malignos, uso em inflamações cutâneas, etc. (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Sua capacidade de resolver misturas racêmicas por síntese de um único enantiômero tem sido explorada pela indústria farmacêutica para produção de

uma série de medicamentos anti-inflamatórios, anticancerígenos e antivirais, dentre outros (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). Foram inicialmente descobertas em fungos (*Penicillium oxalicum* e *Aspergillus flavus*) em 1935, e posteriormente em 1990, foram isoladas a partir de linhagens de *Moraxella* obtidas da água do mar antártico (ZHANG; KIM, 2010).

Outro grupo de importantes enzimas industriais inclui aquelas com capacidade de degradar polissacarídeos, a exemplo de amilases, celulases e pectinases (JOSHI et al., 2013; MUFFLER et al., 2015; UENOJO; PASTORE, 2007). Essas enzimas são empregadas na indústria de alimentos, detergentes, papel e têxtil, biocombustíveis e no manejo de dejetos industriais (MUFFLER et al., 2015).

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido para produção de açúcares simples como glicose, maltose e dextrina (ZHANG; KIM, 2010). Essas moléculas já foram isoladas de micro-organismos marinhos como *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Halomonas*, *Pseudomonas* (GOPINATH et al., 2017; MOHAPATRA; BAPUJI; SREE, 2003) e têm sido amplamente empregadas na indústria alimentícia para produção de xaropes (de milho, glicose e maltose), de sucos e fermentados alcoólicos e pães, bem como na indústria têxtil, no tratamento de dejetos resultantes do processamento de alimentos, na composição de detergentes e de auxiliares digestivos (AIYER, 2005). Na indústria farmacêutica, essas enzimas são utilizadas em preparações que têm por finalidade atuar como facilitadores de processos digestivos, sendo importantes, por exemplo, no tratamento de pacientes com comprometimento das capacidades digestivas devido a uma condição patológica (SENTHIL et al., 2012).

As celulases compreendem um complexo de enzimas que age de forma sinérgica para hidrolisar a celulose em pequenas moléculas de polissacarídeos denominadas celodextrinas (HARSHVARDHAN; MISHRA; JHA, 2013). Essas enzimas podem ser encontradas em uma série de micro-organismos como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Psychrobacter* (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; MUFFLER et al., 2015) e apresentam uma série de aplicações que incluem o uso na indústria de papel e têxtil, de alimentos e bebidas alcoólicas, a produção de biocombustíveis e o tratamento de dejetos oriundos de florestas, campos de agricultura e agroindústrias (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

As pectinases, por sua vez, são enzimas que degradam substâncias pécticas ao hidrolisar ligações glicosídicas de forma despolimerizantes ou desesterificantes.

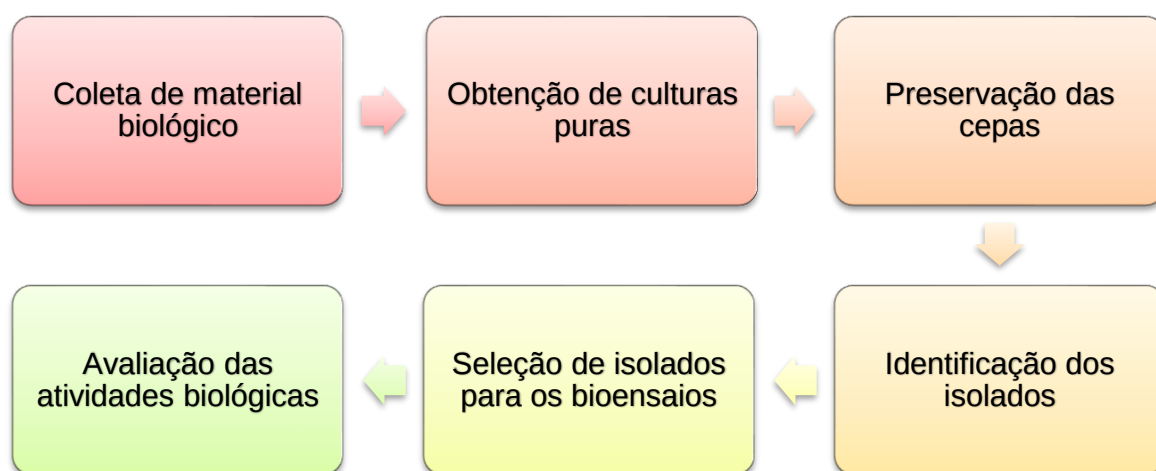
Possuem aplicação na indústria de alimentos como amadurecimento de frutas, clarificação de processamento de sucos de fruta, tratamento de resíduos vegetais, extração de óleos, nutrição animal, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papeis, dentre outros, sendo encontrada em bactérias como *Bacillus*, *Streptomyces* e *Erwinia* (GARG et al., 2016; UENOJO; PASTORE, 2007).

A maioria das enzimas usadas na indústria são de origem microbiana devido à sua alta estabilidade quando comparada a moléculas oriundas de outras fontes (MOHAPATRA; BAPUJI; SREE, 2003). Dentro deste grupo, a complexidade do ambiente marinho induz à adaptação dos micro-organismos e consequentemente produz uma fonte virtualmente inesgotável de novos biocatalisadores com propriedades únicas (ZHANG; KIM, 2010) que lhes permite suportar as condições severas dos processos industriais, tornando-os interessantes objetos para aplicação industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira fase da pesquisa consistiu em conhecer a microbiota associada ao muco de populações sadias do cnidário *P. caribaeorum*. Para tanto, culturas bacterianas puras foram obtidas, identificadas e submetidas a diferentes métodos de preservação. Em seguida, foram selecionados os isolados para investigação de seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma da metodologia empregada



Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

4.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

O estudo foi realizado na área recifal da praia de Porto de Galinhas, município de Ipojuca, litoral sul de Pernambuco. Trata-se de uma região de 900 m de extensão formada por bancos de arenito (LABOREL, 1970) que está dividida em dois setores por um canal de aproximadamente 8 m de profundidade, os quais podem ser facilmente acessados por uso de jangadas. O setor sul (SS) é caracterizado pela presença de piscinas naturais, sendo destinado ao trânsito de turistas, enquanto o setor norte (SN) apresenta uma forte irregularidade no terreno, o que minimiza o acesso ao local (SILVA et al., 2015) (Figura 3).

A localização privilegiada dos recifes próximos à linha da praia facilita o acesso às populações de *P. caribaeorum* durante a maré baixa, quando inúmeras colônias podem ser visualizadas completamente emersas e recobertas por muco. No setor norte, devido à ausência de pisoteamento por turistas, é possível encontrar colônias

mais saudáveis e em maior número (Figura 4).

Figura 3 – Vista aérea dos recifes da praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco



Legenda: (SS) Setor Sul, caracterizado por intenso pisoteamento devido ao trânsito de turistas; (SN) Setor Norte, região não pisoteada.

Fonte: Modificado de Google Earth, versão 7.1.2.2041 (Acesso em: 16 maio 2014).

Figura 4 – Área de estudo localizada na praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco



Legenda: (A,B) Setor norte (acesso restrito); (C) Setor sul (acesso para turistas); (D) Detalhe do procedimento para coleta de material biológico.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2014)

A coleta foi realizada em maio de 2013 e a identificação das colônias de *P. caribaeorum* produtoras de muco foi realizada pelo Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez, do Núcleo de Biologia (CAV/UFPE).

Com auxílio de luvas, diferentes colônias sadias de *P. caribaeorum* (sem sinais aparentes de necrose, infecções, ressecamento ou branqueamento) foram massageadas delicadamente para estimular a produção de muco. Cerca de 400 mL desse material foram então coletados em tubos de polipropileno previamente esterilizados com capacidade para 50 mL (Figura 4d). O material foi mantido em gelo e transportado até o laboratório, onde foi combinado em um frasco único, homogeneizado e em seguida utilizado para o plaqueamento.

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS MARINHAS HETEROTRÓFICAS DO MUCO DE *P. caribaeorum*

Em um ensaio piloto, o muco do zoantídeo foi plaqueado em meio ágar marinho (APÊNDICE A) com utilização de técnicas de espalhamento em superfície e plaqueamento em profundidade, sendo esta última posteriormente selecionada para a obtenção das bactérias marinhas associadas.

Um volume de 1 mL de muco foi adicionado em 10 placas de Petri (90x15 mm), as quais receberam em seguida 20 mL de meio previamente esterilizado e resfriado até aproximadamente 42°C. Após homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante cinco dias e observadas e repicadas diariamente. As colônias isoladas foram repicadas em novas placas pela técnica de esgotamento em estrias até a obtenção de culturas puras.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados marinhos foram analisados quanto aos seus aspectos microscópicos, como coloração de Gram, forma e arranjo das células, e presença de esporos. Em seguida, foram empregadas técnicas de biologia molecular para a identificação das espécies.

4.3.1 Características microscópicas das cepas isoladas

Culturas puras foram repicadas em tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo marinho (APÊNDICE A) e incubadas sob agitação (500 rpm em agitador orbital MA563, Marconi) por 18h a 30°C. Com uma alça graduada, uma alíquota de 10 µL foi espalhada sobre uma lâmina e deixada secar à temperatura ambiente. Após fixação por calor, o material foi submetido à coloração de Gram e observado ao microscópio (Eclipse 80i acoplado a câmera DS Ri1, Nikon; aumento de 1000X).

As culturas que apresentaram forma bacilar foram repicadas em 5 mL de caldo MBS (APÊNDICE A) e incubadas (30°C, 500 rpm) por até 5 dias com observação diária ao microscópio para verificar a ocorrência de esporulação. Em seguida, foram submetidas ao preparo de lâminas a fresco imobilizadas em uma solução aquosa de ágar 3% para o registro fotográfico de esporos em microscopia com contraste de fase (Eclipse 80i acoplado a câmera DS Ri1 e filtro Ph2, Nikon; aumento de 800X).

4.3.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos

A identificação dos isolados marinhos foi realizada a partir do sequenciamento do gene da subunidade 16S do RNA ribossômico (16S rRNA). Para as bactérias identificadas como *Bacillus* sp. também foi realizado o sequenciamento do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (rpoB).

4.3.2.1 Extração do DNA genômico bacteriano

Inicialmente, o DNA genômico (gDNA) foi obtido pelo método de choque térmico (UNIVERSITÄT TÜBINGEN, 2006, com modificações). Um volume de 250 µL de culturas com 18h de incubação foi centrifugado (2688 x g / 6000 rpm, dez minutos – Micro High Speed Refrigerated Centrifuge VS-15000CFN II, Vision Scientific). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em uma solução contendo 50 µL de tampão empregado em reação de cadeia de polimerase (PCR) 1X concentrado e 1 µL de lisozima (10 mg/mL). O material foi congelado por 1h a -20°C e em seguida levado ao termociclador (Biocycler MJ96G, Biosystems) para digestão da amostra por 1h a 60°C, seguida por 15 minutos a 95°C. Após centrifugação (2688 x g, dez minutos), o sobrenadante foi recuperado em novo tubo estéril e

armazenado a -20°C.

O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% a 100 V em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e com o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs) para análise da integridade do DNA. A visualização das bandas foi realizada com GelRed (Biotium) em transiluminador de luz azul acoplado a equipamento de fotodocumentação.

4.3.2.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e rpoB e sequenciamento

A amplificação dos segmentos dos genes de interesse foi realizada por PCR usando-se os pares de iniciadores (do inglês *primers*) fD1/1492R e rpoB-F/rpoB-R para os marcadores 16S rRNA e rpoB, respectivamente (Tabela 1).

Para o gene 16S rRNA, foram preparadas reações de 50 µL contendo: 5 µL de DNA molde, 5 µL de tampão (1X), 1 µL de dNTP's (200 µM), 1,25 µL de cada iniciador (0,25 µM cada), 3 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ 3 mM), 1,25 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U/µL), 12 µL de solução GC-rich (1,2X) e 20,25 µL de água ultrapura. A região do DNA foi amplificada em termociclador (Biocycler MJ96G, Biosystems) utilizando os parâmetros: 94°C por cinco minutos; 25 ciclos de 94°C por um minuto, 54°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos; seguidos de uma etapa de extensão a 72°C por dez minutos.

A reação para o gene rpoB (50 µL) consistiu de: 5 µL de DNA molde, 5,5 µL de tampão (1X), 1,1 µL de dNTP's (200 µM), 1,4 µL de cada iniciador (0,25 µM cada), 3,3 µL de MgCl₂ (3 mM), 1,4 µL de Taq DNA polimerase (1,4 U/µL), 13,2 µL de solução GC-rich (1,2X) e 17,7 µL de água ultrapura. O fragmento foi amplificado em termociclador (Biocycler MJ96G, Biosystems) utilizando os parâmetros: 94°C por cinco minutos; 30 ciclos de 94°C por um minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos; seguidos de uma etapa de extensão a 72°C por dez minutos.

Todos os reagentes foram obtidos da empresa DNA Express Biotecnologia (Guarulhos, São Paulo). Os produtos foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% a 100 V em TBE 0,5X, utilizando o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs). A visualização das bandas foi realizada com GelRed (Biotium) em transiluminador de luz azul acoplado a equipamento de fotodocumentação.

Os produtos de PCR foram então encaminhados à MacroGen Inc. (Seul, Coreia

do Sul) para purificação e sequenciamento em sistema capilar (ABI 3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems) com os pares de iniciadores 27F/1492R e rpoB-F/rpoB-R para 16S rRNA e rpoB, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequências iniciadoras (*primers*) utilizadas para amplificação dos genes 16S rRNA e rpoB dos isolados marinhos

Nome	Sequência 5'–3'	Produto	Referência
fD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG		Weisburg et al. (1991)
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1500 pb	Lane (1991)
1492R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T		Lane (1991)
rpoB-F	AAR YTI GGM CCT GAA GAA AT	740 pb	Drancourt et al (2004);
rpoB-R	TGI ART TTR TCA TCA ACC ATG TG		Durak et al (2006)

Legenda: (A) adenina, (C) citosina, (G) guanina, (T) timina, (I) inosina, (M) adenina ou citosina, (Y) citosina ou timina, (R) adenina ou guanina; (pb) pares de base.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados do GenBank acessado através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com utilização do algoritmo BLASTn² (ALTSCHUL et al., 1990).

4.4 PRESERVAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Inicialmente, as culturas puras foram repicadas em 10 mL de caldo marinho (APÊNDICE A) de modo a se obter uma turbidez compatível com o tubo 1 da escala McFarland. Os tubos foram incubados sob agitação (500 rpm – agitador orbital MA563, Marconi) a 30°C por 16h. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi transferido para Erlenmeyers com capacidade para 500 mL contendo caldo marinho, perfazendo um volume total de 100 mL. O material foi incubado sob agitação (200 rpm – Câmara Incubadora Refrigerada MA832, Marconi) a 30°C por até 48h.

Para as bactérias identificadas como *Bacillus* spp., o meio de cultura utilizado foi o caldo MBS (APÊNDICE A) nas mesmas condições acima, com incubação por 120h para maximizar a produção de esporos.

Ao término do período de incubação, alíquotas dos cultivos foram centrifugadas

² Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

e ressuspensas de acordo com o método de preservação selecionado.

4.4.1 Armazenamento em glicerol

A preservação das células foi realizada em glicerol com base no método de Floodgate e Hayes (1961). Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas (2688 x g, dez minutos – Micro High Speed Refrigerated Centrifuge VS-15000CFN II, Vision Scientific) e o sobrenadante foi desprezado. As células precipitadas foram ressuspensas em uma solução contendo meio estéril e glicerol 40% (1:1, v/v; concentração final de 20%). Os tubos foram mantidos sob congelamento a -20°C.

4.4.2 Liofilização dos isolados marinhos

O restante das culturas foi centrifugado (3824 x g / 6000 rpm, dez minutos – Micro 220R, Hettich) por 15 minutos a 4°C em tubos de polipropileno estéreis com capacidade para 50 mL. O sobrenadante foi desprezado e o volume da biomassa completado com uma solução crioprotetora composta por 10% de sacarose e 1% de gelatina (LOPES, 2016), de modo a se obter uma suspensão dez vezes concentrada. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em frascos de vidro tipo penicilina com tampa de borracha para liofilização.

As amostras foram congeladas a -80°C por aproximadamente 16h e posteriormente transferidas para o liofilizador (Sentry 2.0, VirTis, SP Scientific). O processo de secagem foi realizado por até 48h a -50°C, com vácuo a 300 mT. Os frascos foram lacrados e armazenados à temperatura ambiente.

4.4.2.1 Determinação da concentração das amostras liofilizadas

A concentração do material liofilizado foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).

O conteúdo de um dos frascos foi ressuspendido em 1 mL de salina 0,85% e diluído seriadamente (diluição decimal) até 10^{-10} . Em seguida, 40 µL de cada diluição foram plaqueados em meio ágar marinho e incubados a 30°C por 24h para contagem. Os resultados foram expressos em UFC/mL após cálculo segundo a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de colônias} \times \text{Fator de diluição})}{\text{Volume plaqueado em mL}}$$

4.5 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM SUBSTRATO SÓLIDO

Os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* foram investigados quanto à capacidade de produção das enzimas em substrato sólido: amilase, celulase, esterase, lipase, pectinase (poligalacturonase e pectato liase) e protease (caseinase e gelatinase).

Os estoques em glicerol das cepas marinhas foram reativados em 5 mL de caldo nutriente com inóculo de 5% (v/v). Após incubação a 30°C por 24h a 500 rpm (agitador orbital MA563, Marconi), a densidade óptica dos cultivos foi ajustada por espectrofotometria (600 nm – GENESYS 10S UV-Vis, Thermo Scientific) para o tubo 1 da escala McFarland. As amostras padronizadas foram utilizadas para semear novos tubos de ensaio com caldo nutriente, mantendo-se a mesma proporção de inóculo e condições de incubação do cultivo anterior.

Em seguida, placas de Petri (150 x 25 mm) foram preparadas em duplicata contendo os meios específicos para cada enzima (APÊNDICE A): **amilase** – ágar nutriente suplementado com 0,2% amido (p/v) (FEBY; NAIR, 2010); **celulase** – ágar celulose (KASANA et al., 2008, modificado) suplementado com 1% (p/v) de papel de filtro de baixa gramatura (18 g/m³); **lipase** e **esterase** – ágar peptona (SIERRA, 1957) suplementado com 1% polissorbato 80 (p/v) para lipase e 1% polissorbato 20 (p/v) para esterase (KUMAR et al., 2012); **pectinases** – ágar pectina suplementado com 0,5% de pectina cítrica (p/v) e ajustado para pH 5 (poligalacturonase) ou pH 8,5 (pectato liase) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975, modificado); **proteases** – ágar nutriente (FEBY; NAIR, 2010) suplementado com 5% de leite desnatado (v/v) para caseinase (FEBY; NAIR, 2010) e 1,5% de gelatina (p/v) para gelatinase (SMITH JR; GOODNER, 1958).

As placas foram semeadas com 5 µL das culturas crescidas pelo método de plaqueamento em gotas. Após incubação a 30°C por 48h, a produção enzimática foi confirmada pela presença de halos em torno das colônias, evidenciados por uso de soluções reveladoras (APÊNDICE B), quando necessário: solução de Lugol para pectinases, celulase e amilase (FEBY; NAIR, 2010; KASANA et al., 2008; SOARES;

SILVA; GOMES, 1999, respectivamente) e solução de ácido acético 5% para proteases (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Para estes reveladores, a presença de uma zona clara em torno das colônias indicou resultado positivo para atividade enzimática. Para esterase e lipase, a atividade foi confirmada pela presença de zonas de precipitação em torno das colônias, melhor visualizadas após incubação das placas a 4°C por 12h (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998).

O diâmetro das colônias e dos halos foi medido em milímetros e a média dos valores das duplicatas foi empregada no cálculo da zona de precipitação (Pz), que corresponde à razão entre o diâmetro das colônias e o diâmetro dos halos (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Os resultados foram expressos nas categorias A ($Pz = 1$; sem atividade enzimática), B ($0,63 < Pz < 1$; atividade enzimática moderada) ou C ($Pz \leq 0,63$; forte atividade enzimática).

4.6 ATIVIDADE BIOLARVICIDA DE ISOLADO DE *Bacillus*

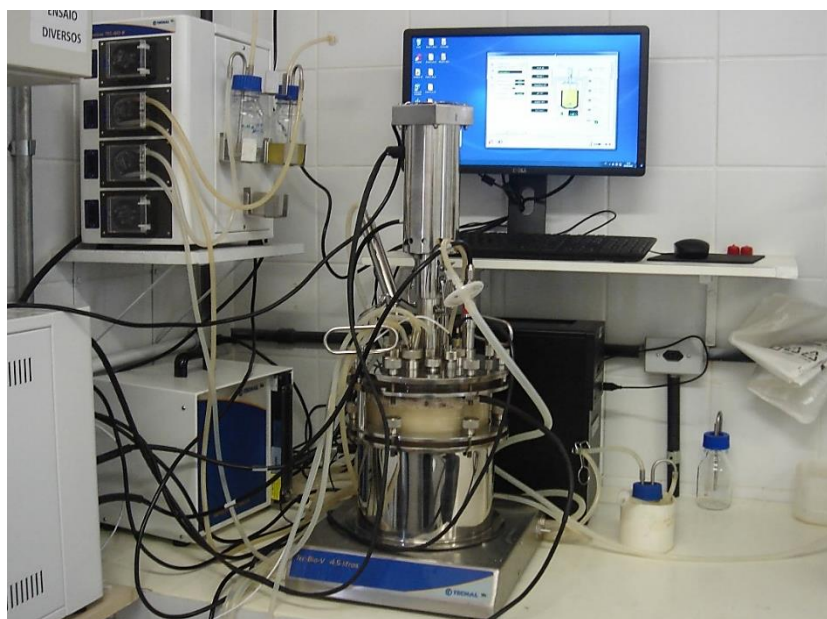
O isolado marinho identificado como *B. thuringiensis* BCLTHR-01 foi investigado quanto à sua capacidade de produção de cristais de toxinas através de fermentação líquida submersa em meio MBS (APÊNDICE A). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.1 Cultivo do isolado *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 em biorreator

Inicialmente, o inóculo de cada fermentação foi preparado em dois frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 1 L. A concentração inicial de células foi ajustada para 10^6 UFC/mL, perfazendo um volume total de 150 mL de cultivo por frasco. O material foi incubado sob agitação (200 rpm – Câmara Incubadora Refrigerada MA832, Marconi) a 30°C por 16h.

Em seguida, o processo fermentativo foi conduzido em biorreator operando em batelada, com capacidade nominal de 5 L e volume útil de meio de 3 L (Figura 5). O cultivo foi realizado por 72h a 30°C com vazão de ar de 0,8 vvm, a 250 rpm e concentração de inóculo de 10% (v/v). O pH do cultivo foi ajustado inicialmente para 7,2 após a adição do inóculo. As variáveis pH e oxigênio dissolvido foram monitoradas ao longo de todo o processo.

Figura 5 – Biorreator de bancada utilizado para os cultivos de *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 realizados no Laboratório de Bioprocessos - CAV/UFPE



Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

4.6.2 Monitoramento do processo fermentativo de BCLTHR-01

A cada 24h, amostras foram coletadas para realização das análises microscópicas (observação de esporos e cristais de toxinas) e microbiológicas (determinação da concentração e pureza das amostras).

4.6.2.1 Observação da produção de toxinas e esporos de BCLTHR-01

Esfregaços da cultura foram preparados para coloração com Azul de Coomassie 0,25% em etanol e ácido acético glacial segundo o método proposto por Sharif e Alaeddinoğlu (1988). Inicialmente, foi o esfregaço da cultura em lâmina foi deixado secar à temperatura ambiente, sendo em seguida rapidamente fixado por calor. O material foi coberto com a solução corante por cerca de 3 minutos e posteriormente lavado com água destilada. Após secagem, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (Eclipse 80i acoplado a câmera DS Ri1, Nikon; aumento de 1000X). Este método permite a visualização de cristais de toxinas que, juntamente com células vegetativas e esporângios, são corados em azul intenso. Os esporos (livres ou dentro das células) não são corados por esta técnica, podendo ser facilmente diferenciados das demais estruturas.

4.6.2.2 Determinação da concentração de células do cultivo de BCLTHR-01

A concentração das amostras do caldo fermentado foi determinada pela quantificação de células totais e de esporos viáveis, através da contagem de colônias crescidas sobre a superfície de placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente (APÊNDICE A).

Alíquotas do cultivo foram diluídas e semeadas nas placas e incubadas a 30°C por 24h. Para a contagem dos esporos, as amostras foram previamente submetidas a choque térmico a 80°C por 12 minutos para eliminação das células vegetativas. Os resultados foram expressos em UFC/mL (ver etapa 4.4.2.1).

4.6.2.3 Extração e quantificação de proteínas totais do cultivo de BCLTHR-01

Em microtubos com capacidade para 2 mL, cerca de 200 µL de amostras do cultivo de BCLTHR-01 foram precipitados com 1,6 mL de acetona gelada (proporção de 1:8) por 1h a -20°C. Os tubos foram centrifugados (7467 x g / 10000 rpm a 4°C por 20 minutos – Micro High Speed Refrigerated Centrifuge VS-15000CFN II, Vision Scientific) e em seguida lavados duas vezes com 1 mL de acetona gelada.

Após secagem das amostras à temperatura ambiente por dez minutos, foram adicionados 100 µL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 50 mM. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 1h, com agitação em vórtex a cada dez minutos.

Após centrifugação (7467 x g, 10°C, 20 minutos), o sobrenadante foi transferido para microtubos com capacidade para 500 µL e posteriormente armazenados a -20°C até o momento de uso.

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford (1976), com utilização de albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O padrão BSA foi diluído em NaOH 50 mM em diferentes concentrações variando de 0,0625 a 1 mg/mL para amostras de caldo fermentado total e de 1 a 4 mg/mL para amostras da biomassa concentrada.

Em microtubos com capacidade para 2 mL, as reações foram preparadas em triplicata contendo 790 µL de água destilada, 10 µL da amostra³ e 200 µL do reativo

³ O termo “amostra” refere-se a BSA para curva-padrão, extratos de proteínas para os fermentados ou NaOH 50 mM para o branco.

de Bradford. Após agitação em vórtex, os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por cinco minutos e a absorbância foi determinada a 595 nm, tomando-se o cuidado para não ultrapassar o período de 20 minutos após o preparo das amostras.

Os valores das leituras da curva-padrão foram plotados em gráfico no Excel com as absorbâncias no eixo das abscissas e suas respectivas concentrações no eixo das ordenadas. Considerando-se o coeficiente de determinação $R^2 > 0,95$, a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas das amostras, expressa como média dos valores obtidos.

4.6.3 Avaliação da atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

Com base na análise das lâminas para verificar a presença de cristais, foram selecionadas amostras das culturas crescidas após 48h e 72h de incubação para verificação da atividade larvicida.

4.6.3.1 Obtenção da biomassa de BCLTHR-01

As células foram separadas pelo processo de floculação/sedimentação descrito por Luna (2004) para obtenção da biomassa ativa concentrada, formada principalmente por esporos e cristais de toxinas.

As amostras foram coletadas em frascos tipo Schott estéreis contendo uma barra magnética. Com auxílio de um agitador magnético (Agitador Magnético com Aquecimento TE-0851, Tecnal), o pH do cultivo foi ajustado para 3 com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 5 M sob rápida agitação (velocidade 3) para homogeneização das amostras. Em seguida, os tubos foram mantidos sob lenta agitação (velocidade 1) por cinco minutos para permitir a floculação. Os frascos foram então armazenados a 4°C para sedimentação da biomassa por um período de até 24h.

Ao término da incubação, o líquido metabólico foi desprezado e o pH da biomassa concentrada foi novamente ajustado para 7. O material foi mantido a 4°C até o momento de uso.

4.6.3.2 Bioensaios

Alíquotas das biomassas concentradas de BCLTHR-01 foram enviadas ao Insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) para realização dos bioensaios frente larvas de *A. aegypti*.

Foram utilizadas larvas L₄ do mosquito provenientes da colônia Recife-Laboratório (Rec-L), mantida no Insetário do CPqAM/FIOCRUZ desde 1996 nas condições: 26 ± 2°C, umidade relativa de 65% a 85%, fotoperíodo de 12/12 horas (claro e escuro) e alimentadas com ração para gatos (Whiskas®) previamente esterilizadas e maceradas.

A avaliação da atividade larvicida seguiu o método proposto por De Barjac e Larget-Thiéry (1984), em triplicata. Grupos homogêneos de 20 larvas L₄ foram expostos a diferentes concentrações das amostras de BCLTHR-01 em recipientes contendo 100 mL de água destilada. O controle foi preparado da mesma forma, exceto pela adição do produto fermentado. Após o período de 24 horas de incubação, o número de mortos foi registrado e os dados de mortalidade analisados por regressão linear log-probit usando o programa SPSS Statistics 8.0 para Windows (1997).

Inicialmente, foi realizado um bioensaio exploratório que consistiu na exposição das larvas a concentrações duas, quatro e dez vezes maiores que uma concentração pré-estabelecida para determinação do valor inferior e superior do intervalo de concentrações em que ocorre a presença de atividade biológica. Com base neste resultado, foram selecionadas sete concentrações com mortalidades variando entre 10% e 99% para estimar o valor das concentrações letais para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O muco produzido por colônias de *P. caribaeorum* possui uma alta viscosidade que dificulta sua manipulação. Em um experimento piloto, alíquotas de 1 mL de muco foram semeadas em meio sólido empregando-se as técnicas de espalhamento em superfície (*spread plate*) e em profundidade (*pour plate*) de modo a selecionar o melhor método para o isolamento das bactérias marinhas associadas. No espalhamento em superfície, foi observado que o muco não foi completamente absorvido pelo meio e permaneceu concentrado próximo ao ponto de semeadura, o que dificultou o isolamento das bactérias. No plaqueamento em profundidade, embora o muco não tenha apresentado uma distribuição uniforme no meio, foi observado o crescimento de colônias bem isoladas e, desta forma, esta técnica foi selecionada para o presente trabalho.

5.1 ISOLAMENTO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS BACTÉRIAS MARINHAS ASSOCIADAS AO MUCO DE *P. caribaeorum*

Ao todo, foram isoladas 281 bactérias marinhas associadas ao muco do cnidário *P. caribaeorum*, das quais 226 (80%) perderam a viabilidade, em sua maioria, durante as etapas de subcultivo. No processo de isolamento, é possível que o crescimento dessas bactérias tenha sido estimulado pela presença de nutrientes oriundos do muco e/ou de metabólitos produzidos durante o crescimento concomitante de diferentes espécies bacterianas, os quais contribuíram para a formação de um nicho ecológico benéfico ao seu desenvolvimento. Uma vez isoladas em culturas puras, essas linhagens não mais teriam acesso a esses nutrientes, resultando na sua incapacidade de crescimento em meio de cultura artificial.

Com o avanço de técnicas moleculares independentes de cultivo, tem se tornado evidente que a maioria das espécies bacterianas conhecidas não são passíveis de cultivo em condições laboratoriais. Isto deve-se, em parte, ao desconhecimento do metabolismo desses micro-organismos que resulta na incapacidade de compor um meio de cultura adequado capaz de fornecer nutrientes e metabólitos necessários para seu crescimento, podendo também ser decorrente de emprego de condições inadequadas de incubação, no tocante a temperatura, pH, níveis de oxigênio, pressão atmosférica e período de incubação (VARTOUKIAN;

PALMER; WADE, 2010).

A presença de conjuntos de micro-organismos interdependentes, denominados de consórcios bacterianos, já foi observada por outros autores e tem sido utilizada como base para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo (PANDE; KOST, 2017; VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010), especialmente úteis no ambiente marinho. Em ambientes naturais, as bactérias estão constantemente interagindo com diferentes comunidades microbianas através de sinalizações físicas e químicas que desempenham um papel importante na regulação da estrutura e da sobrevivência da comunidade (PANDE; KOST, 2017). Dessa forma, o sucesso no isolamento de bactérias fortemente dependentes dos fatores acima mencionados está diretamente condicionado à habilidade dos pesquisadores em reproduzir tais condições em laboratório.

Foi observado também que outra parcela dentre os isolados obtidos pode ser cultivada em meio artificial com sucesso, mas perdeu sua viabilidade após a liofilização, sugerindo que a solução crioprotetora empregada não foi adequada ou que as cepas são sensíveis a este método de preservação. Em um estudo conduzido por Floodgates e Hayes (1961), foi verificado que culturas marinhas de corinebactérias, flavobactérias e micrococcos são resistentes ao processo de liofilização, enquanto espécies de *Vibrio* não são bem preservadas por este método, apresentando grandes perdas de viabilidade. Vários autores têm demonstrado que não existe um protocolo único para preservação dos diferentes micro-organismos e que a escolha do crioprotetor corresponde à variável com maior impacto na viabilidade durante a liofilização e manutenção das cepas; além disso, as condições ótimas de preservação variam conforme a espécie e até mesmo o equipamento utilizado (PEIREN et al., 2015), sendo necessária uma investigação aprofundada para adequar os métodos de preservação às diferentes necessidades de cada micro-organismo.

A concentração celular das 55 culturas bacterianas que permaneceram viáveis após liofilização (20%) foi de 10^8 UFC/mL, cuja forma celular predominante do tipo bacilo Gram positivo, com células individualizadas ou formando longas cadeias. Esse resultado também está vinculado ao método de preservação utilizado, uma vez que bactérias Gram-positivas sobrevivem melhor ao processo de liofilização quando comparadas às Gram-negativas (STOLP; STARR, 1981).

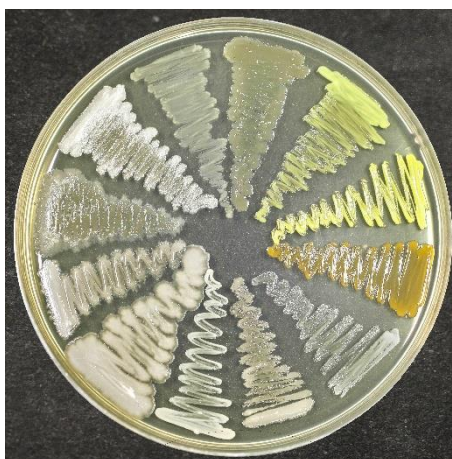
Dentre os bacilos obtidos, apenas 19 isolados produziram esporos em condições de aerobiose, sendo posteriormente identificados como *Bacillus* spp.

(APÊNDICE C).

Em geral, bactérias isoladas da coluna d'água marinha são predominantemente Gram-negativas, enquanto bactérias Gram-positivas dominam os sedimentos, especialmente *Bacillus* spp. (ANWAR; CHOI, 2014; GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007; GRANT; LONG, 1981; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2010). Uma vez que as colônias de *P. caribaeorum* são bentônicas, sésseis e incorporam sedimentos em seus tecidos durante o crescimento (HAYWICK; MUELLER, 1997), este zoantídeo se apresenta como um substrato perfeito para o assentamento e desenvolvimento de bactérias Gram-positivas, corroborando com os resultados observados neste estudo.

Os isolados marinhos obtidos geralmente se apresentaram pigmentados, exibindo tons de branco, amarelo e laranja entre 24h e 48h de incubação (Figura 6).

Figura 6 – Colônias de bactérias marinhas isoladas do muco de *Palythoa caribaeorum*



Fonte: Liany F. de A. Melo (2015).

A produção de pigmentos é um fenômeno comum encontrado em micro-organismos que habitam superfícies no ambiente marinho, e acredita-se que sua principal função seja fornecer proteção contra radiação solar (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2010; RAVINDRAN et al., 2013). Em Porto de Galinhas, as colônias de cnidários que abrigam essas bactérias pigmentadas podem ser encontradas na superfície de formações rochosas na zona intermareal. Graças ao ciclo semidiurno das marés, essas colônias são completamente expostas durante a maré baixa, permanecendo vulneráveis às condições hostis do ambiente. Dessa forma, é esperado que esses animais tenham desenvolvido adaptações para sobreviver neste ambiente, incluindo as associações com micro-organismos benéficos.

As bactérias encontradas nas zonas intermareais precisam desenvolver mecanismos para tolerar as rápidas flutuações das condições ambientais, como grandes variações de temperatura, luminosidade, salinidade, ação das ondas, raios UV e repetidos períodos de seca (LOZADA; DIONISI, 2015; MCKEW et al., 2011). Uma das suas adaptações é o crescimento em forma de biofilmes, que fornecem microambientes de intensas interações tanto biológicas quanto químicas (LOZADA; DIONISI, 2015), resultando na produção de uma série de metabólitos com potencial de aplicação industrial, a exemplo de biopolímeros, lipídios e enzimas (ORTEGA-MORALES et al., 2010).

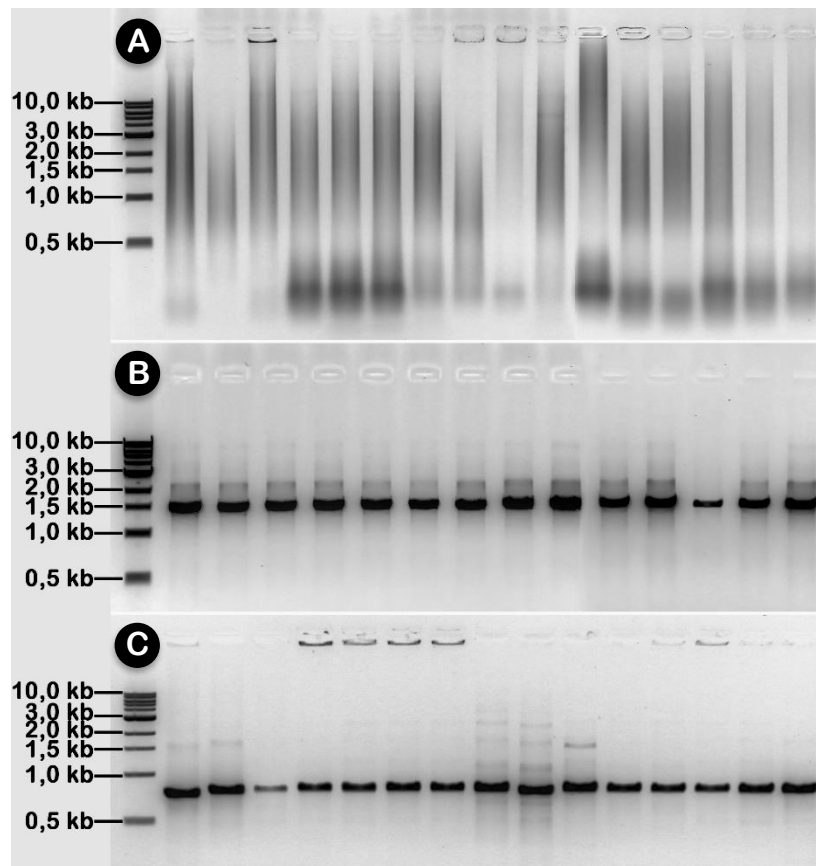
5.2 ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA HETEROTRÓFICA ASSOCIADA AO MUCO DE *P. caribaeorum*

Através do método de extração de material genético empregado, foi possível a obtenção do DNA genômico das cepas viáveis isoladas, com posterior amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA e rpoB (Figura 7). O sequenciamento dos amplicons obtidos revelou que os isolados pertencem a quatro filos distintos, com Firmicutes sendo o grupo dominante (67% dos isolados), seguido por Actinobacteria (20%), Proteobacteria (9%) e Bacteroidetes (4%) (Figura 8). Foram identificadas 18 espécies distribuídas em oito gêneros diferentes (Tabela 2).

Os gêneros identificados para o filo Firmicutes foram *Bacillus* (19 isolados), *Exiguobacterium* (9) e *Staphylococcus* (9). Para Actinobacteria, os gêneros mais abundantes foram *Brevibacterium* (4) e *Corynebacterium* (4), seguidos por *Micrococcus* (3). Proteobacteria foi o terceiro grupo dominante, com todos seus representantes pertencentes ao gênero *Vibrio* (5). Por fim, o filo Bacteroidetes foi representado por apenas dois isolados pertencentes ao gênero *Tenacibaculum*.

Dentre as 18 espécies identificadas, as mais frequentemente isoladas foram *E. aurantiacum* (16%) e *S. cohnii* (13%). Por sua vez, as espécies menos frequentes foram *B. frigilitolerans*, *B. halosaccharovorans*, *B. oceanisediminis*, *B. thuringiensis*, *M. yunannensis*, *V. neocaledonicus*, com um isolado cada (2%). Outras espécies incluíram *B. licheniformis*, *B. subtilis* subesp. *subtilis*, *B. xiamenensis*, *B. luteolum*, *C. xerosis* e *V. azureus* (7%), *B. altitudinis* (5%) e *M. aloeverae*, *S. warneri*, *T. mesophilum* (4%) (Tabela 2).

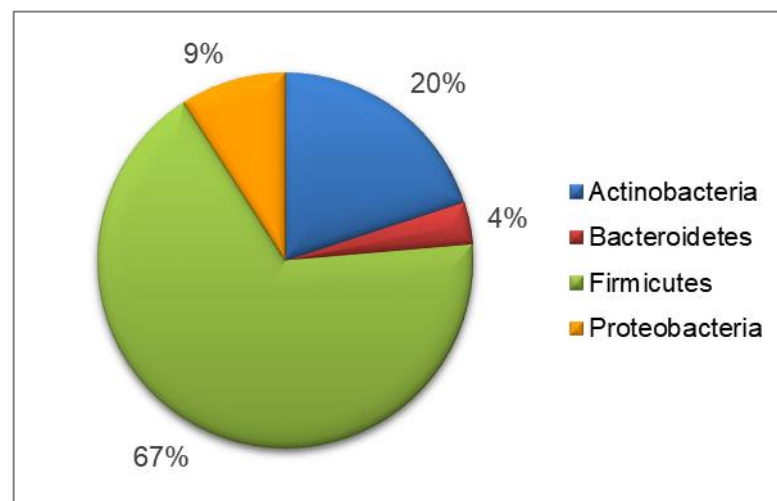
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico extraído e dos marcadores moleculares amplificados para os isolados marinhos bacterianos



Legenda: (A) DNA genômico extraído; (B) amplificação do gene 16S rDNA com tamanho em torno de 1500 pares de base; (C) amplificação do gene rpoB de *Bacillus* spp. com tamanho em torno de 700 pares de base; (kb) quilobase = 1000 pares de base.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

Figura 8 – Composição da comunidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* ao nível de filo



Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

Tabela 2 – Espécies e frequência das bactérias marinhas isoladas do muco de *Palythoa caribaeorum*

Isolados	Identidade (BLASTn)	Nº Isolados	Filo
BCLALT-01 a 03	<i>Bacillus altitudinis</i>	3 (5%)	Firmicutes
BCLFRG-01	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	1 (2%)	Firmicutes
BCLHSC-01	<i>Bacillus halosaccharovorans</i>	1 (2%)	Firmicutes
BCLLNF-01 a 04	<i>Bacillus licheniformis</i>	4 (7%)	Firmicutes
BCLOCE-01	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	1 (2%)	Firmicutes
BCLSUB-01 a 04	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	4 (7%)	Firmicutes
BCLTHR-01	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1 (2%)	Firmicutes
BCLXMN-01 a 04	<i>Bacillus xiamenensis</i>	4 (7%)	Firmicutes
BRVLTL-01 a 04	<i>Brevibacterium luteolum</i>	4 (7%)	Actinobacteria
CRNXRO-01 a 04	<i>Corynebacterium xerosis</i>	4 (7%)	Actinobacteria
EXGAUR-01 a 09	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	9 (16%)	Firmicutes
MCRALV-01 a 02	<i>Micrococcus aloeverae</i>	2 (4%)	Actinobacteria
MCRYUN-01	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	1 (2%)	Actinobacteria
STACOH-01 a 07	<i>Staphylococcus cohnii</i>	7 (13%)	Firmicutes
STAWRN-01 a 02	<i>Staphylococcus warneri</i>	2 (4%)	Firmicutes
TNAMPH-01 a 02	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	2 (4%)	Bacteroidetes
VIBAZR-01 a 04	<i>Vibrio azureus</i>	4 (7%)	Proteobacteria
VIBNCL-01	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	1 (2%)	Proteobacteria
Total		55 (100%)	

Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

A dominância de representantes dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria também foi observada em outros trabalhos com *P. caribaeorum*, envolvendo tanto técnicas dependentes de cultivo a partir de amostras de muco (CAMPOS, 2011; CAMPOS et al., 2015) quanto abordagens moleculares a partir de amostras de tecidos (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; PAULINO et al., 2017).

Campos (2011) investigou a comunidade bacteriana associada ao muco de colônias sadias e branqueadas de *P. caribaeorum* oriundas de duas praias do litoral pernambucano. O autor relata a obtenção de 50 isolados, dos quais 36 foram obtidos na praia de Porto de Galinhas, com predominância da classe Gammaproteobacteria, representada principalmente por espécies de *Vibrio* spp. Apesar de nenhum dos

isolados por ele identificados ao nível de espécie terem sido encontrados no presente trabalho, o autor também cita a presença de representantes dos gêneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* e *Vibrio*.

5.2.1 Firmicutes: *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Staphylococcus*

Em geral, a literatura especializada descreve que o grupo de bactérias marinhas mais abundante encontrado em associação com zoantídeos e corais pertence ao filo Proteobacteria, principalmente representantes do gênero *Vibrio*, como *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* (AUSTIN; ZHANG, 2006; CAMPOS, 2011; CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; CERVINO et al., 2004; CHIMETTO et al., 2008; LUNA; BIAVASCO; DANOVARO, 2007; PAULINO et al., 2017). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que Firmicutes foi o filo dominante, com a maioria dos isolados identificados como *Bacillus* spp. (pouco abundantes, porém diversos) (Figura 8, Tabela 2). Um resultado semelhante foi relatado por Seeman e colaboradores (2009) ao avaliar a presença de bactérias hemolíticas associadas ao zoantídeo. Em ambos os casos, os métodos de triagem empregados podem ter favorecido um determinado grupo de organismos em detrimento de outras espécies mais fastidiosas. No presente trabalho, a identificação molecular foi apenas realizada nas culturas puras que puderam ser preservadas com sucesso, o que se apresentou como um fator limitante para o conhecimento da diversidade microbiana simbiote.

As espécies de *Bacillus* spp. isoladas de *P. caribaeorum* já foram relatadas para o ambiente marinho, principalmente as pertencentes ao grupo de *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. amiloliquefaciens* (CAMPOS, 2011; GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007; LIU et al., 2013; MENEZES et al., 2010). Podem ser encontradas associadas a diversos invertebrados como corais, ascídias, esponjas (CERVINO et al., 2004; MENEZES et al., 2010). Esses micro-organismos são conhecidos por sua capacidade de produção de esporos altamente resistentes a elevadas temperaturas, irradiação e dessecação, podendo permanecer viáveis no ambiente por milhares de anos (MUNN, 2011). Membros deste grupo podem metabolizar uma gama de diferentes compostos incluindo açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos (ATKINSON; WRAY; FISHER, 1990; REID; ABRATT, 2005; SEO; KEUM; LI, 2009), sendo capazes de sintetizar uma série de antibióticos

cl clinicamente importantes (SHNIT-ORLAND; KUSHMARO, 2009), tornando-os interessantes alvos para bioprospecção.

O gênero *Bacillus* apresenta uma taxonomia complicada, sendo difícil a distinção entre espécies apenas baseada em testes bioquímicos ou estruturas celulares (GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007). O emprego do marcador molecular 16S rDNA, “universal” para Eubacteria, também não fornece uma boa resolução, uma vez que diferentes espécies podem apresentar até 99,9% de similaridade em suas sequências, sendo útil apenas na identificação dos organismos ao nível de gênero. Dessa forma, faz-se necessário o uso de marcadores complementares específicos, como o *rpoB*, que consistem em regiões conservadas no genoma do grupo, mas que apresentam uma velocidade de evolução molecular suficiente para permitir a diferenciação interespecífica (LIU et al., 2013).

O gênero *Exiguobacterium* se apresentou como o segundo grupo dominante dentro de Firmicutes, com *E. aurantiacum* correspondendo à espécie mais abundante nas amostras de muco analisadas (Tabela 2). Organismos pertencentes a esse gênero têm sido encontrados em diversos ambientes, apresentando ampla plasticidade morfológica, alta tolerância a variações extremas de temperatura (-12°C a 55°C), salinidade (até 13% de NaCl), valores de pH (5 a 11) e estresse causado por radiação ultravioleta e presença de metais pesados (ORDOÑEZ et al., 2013; VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009). Esses micro-organismos podem fermentar vários tipos de compostos, o que lhes confere propriedades únicas de interesse para biotecnologia, biorremediação, processos industriais e agricultura (VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009).

Os isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são micro-organismos comensais naturalmente encontrados em humanos e outros animais inclusive no ambiente marinho (LINDSAY, 2011; MENEZES et al., 2010). Ocasionalmente, esses organismos podem se comportar como patógenos oportunistas, infectando diretamente o hospedeiro ou servindo como “probiótico” para outros patógenos, à medida que auxilia processos de crescimento e formação de biofilmes (RAMI et al., 2014; YIAGNISIS; ATHANASSOPOULOU, 2011).

5.2.2 Actinobacteria: *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*

As actinobactérias também figuram entre os micro-organismos isolados do

muco de *P. caribaeorum*, representadas pelos gêneros *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* (Tabela 2). De modo geral, são bactérias mais comumente associadas ao solo ou aquáticas, as quais desenvolvem importantes papéis ecológicos como participação no processo de ciclagem de nutrientes (SERVIN et al., 2008), também previamente relatadas no ambiente marinho (MENEZES et al., 2010; PARROT et al., 2015).

As actinobactérias apresentam um amplo repertório morfológico e bioquímico, produzindo cerca de dois terços de todos os antibióticos de origem natural atualmente em uso clínico, além de fornecer uma série de compostos com propriedades anticancerígenas, anti-helmínticas e antifúngicas (BARKA et al., 2016). Esses organismos também apresentam a capacidade de produzir surfactantes para biorremediação de áreas impactadas (VILELA et al., 2014).

5.2.3 Proteobacteria: *Vibrio*

As bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria isoladas do muco de *P. caribaeorum* são todas pertencentes ao gênero *Vibrio* (Tabela 2), um grupo amplamente distribuído no ambiente marinho e particularmente abundante na superfície (incluindo o muco) de invertebrados como corais, zoantídeos, ascídias e esponjas (CASTRO et al., 2010; CHIMETTO et al., 2009; CHIMETTO et al., 2008; MENEZES et al., 2010; REIS et al., 2009).

Embora muitas destas espécies marinhas sejam considerados patogênicas (AROTSKER et al., 2009; BOURNE et al., 2009; CHATTERJEE; HALDAR, 2012), alguns micro-organismos têm demonstrado um grande potencial biotecnológico, como aquelas encontradas no presente trabalho. As proteínas luminescentes produzidas por *V. azureus*, por exemplo, podem ser potencialmente utilizadas no preparo de sondas e marcadores fluorescentes de sistemas vivos para estudos de expressão e silenciamento gênicos (CHUDAKOV et al., 2010; YOSHIZAWA et al., 2012). Essa espécie também tem sido utilizada para produção de polímeros biocompatíveis (SASIDHARAN; BHAT; CHANDRASEKARAN, 2015) e de enzimas com aplicações médicas (KIRUTHIKA; SARASWATHY, 2013). *V. neocaledonicus*, por sua vez, tem sido explorado como fonte de exopolissacarídeos com potencial de aplicação na medicina para cura de lesões e reparos ósseos e como bioissorventes para metais pesados (CHALKIADAKIS et al., 2013), além de produzir moléculas com propriedades

anticorrosivas para estruturas de aço no ambiente marinho (MORADI; XIAO; SONG, 2015).

Da mesma forma que ocorre para as espécies de *Bacillus*, a identificação dos vibrios é uma tarefa árdua. Semelhanças fenotípicas e uma similaridade acima de 98% entre as sequências interespecíficas de 16S rDNA (MAEDA et al., 2001) faz com que sejam necessárias análises por sequências multilocus para uma identificação precisa e reconstrução filogenética dentro do grupo (SAWABE et al., 2013).

5.2.4 Bacteroidetes: *Tenacibaculum mesophilum*

O filo Bacteroidetes foi representado apenas pela espécie *T. mesophilum* na comunidade bacteriana associada ao muco de *P. caribaeorum* (Tabela 2). Este clado é um dos grupos dominantes no ambiente marinho, sendo conhecidos por sua capacidade de decomposição de biomacromoléculas como celulose, ágar e quitina, desempenhando um papel importante na ciclagem de carbono (SUZUKI et al., 2001).

A composição da comunidade bacteriana presumidamente reflete o papel metabólico desses micro-organismos na saúde do hospedeiro, com consequente participação nos ciclos biogeoquímicos dos oceanos. Sendo assim, ao abrigar bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos, fixar nitrogênio, metabolizar enxofre e produzir enzimas e substâncias antimicrobianas, o zoantídeo *P. caribaeorum* se beneficia através da assimilação de compostos complementares ao seu metabolismo e da aquisição de um mecanismo adicional de defesa contra patógenos (RABELO, 2012; SHNIT-ORLAND; KUSHMARO, 2009).

5.3 PERFIL ENZIMÁTICO DE CEPAS DE *Bacillus* spp. ASSOCIADAS AO MUCO DE *P. caribaeorum*

Os métodos de triagem de enzimas microbianas baseados na análise em meio sólido fornecem uma abordagem direta, rápida e simples que permite a semiquantificação da atividade enzimática através da análise de zonas de hidrólise (CESKA, 1971). A grande vantagem é possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo, sendo possível também a correlação dos resultados com a sobrevivência dos micro-organismos, uma vez que a informação da expressão enzimática também pode estar ligada à habilidade de crescimento em meios

específicos.

Para o presente trabalho, apenas os isolados identificados como *Bacillus* spp. foram selecionados para investigação do potencial de produção de enzimas em meio sólido por apresentarem algumas características interessantes, como facilidade de manutenção das cepas devido principalmente à capacidade de esporulação e bom crescimento nos meios de cultura usualmente empregados em laboratório.

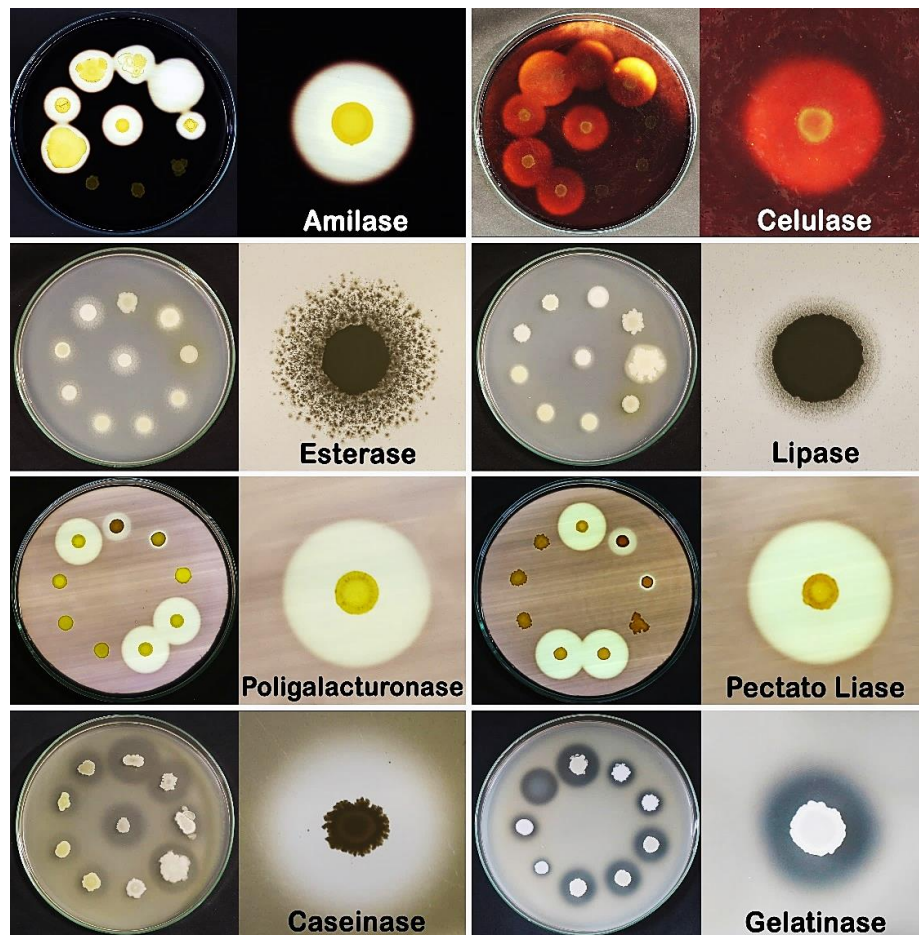
Em um ensaio piloto, os isolados bacterianos foram cultivados em ágar nutriente para verificar se as culturas apresentavam a capacidade de crescimento em meio desprovido de sais marinhos. Visto que todas as cepas se encontravam adaptadas a esta condição, os ensaios de atividade biológica foram realizados em meios específicos sem que houvesse a necessidade de ajuste da salinidade.

Todos os 19 isolados de *Bacillus* spp. (APÊNDICE C) apresentaram resultados positivos para pelo menos quatro das oito enzimas investigadas, observados pela formação de zonas de hidrólise em torno das colônias após 48h de incubação (Figura 9, Figura 10). Dependendo da enzima testada, a hidrólise do substrato só pode ser observada após a adição de substâncias específicas nas placas (APÊNDICE B). Para amilase, celulase e pectinase, a solução de iodo reagiu com o substrato não hidrolisado no meio produzindo uma coloração azul (amilase) ou avermelhada (celulase e pectinase), revelando zonas claras em torno das colônias como indicativo de reação positiva. A adição de soluções ácidas às placas de protease promoveu a precipitação do substrato não hidrolisado, resultando na formação de zonas claras de hidrólise em um meio opaco. Para os ensaios de lipase e esterase, a hidrólise dos polissorbatos resultou na produção de ácidos graxos, os quais formaram um complexo com o cálcio presente no meio que pode ser visualizado na forma de cristais insolúveis em torno das colônias (Figura 9).

A enzima mais frequente entre as bactérias marinhas estudadas foi a gelatinase, produzida por todas as cepas (19 isolados), seguida pela esterase (18), caseinase (17), amilase (12), poligalacturonase (12) e pectato liase (12). As enzimas menos frequentes foram celulase (11) e lipase (11) (Tabela 3).

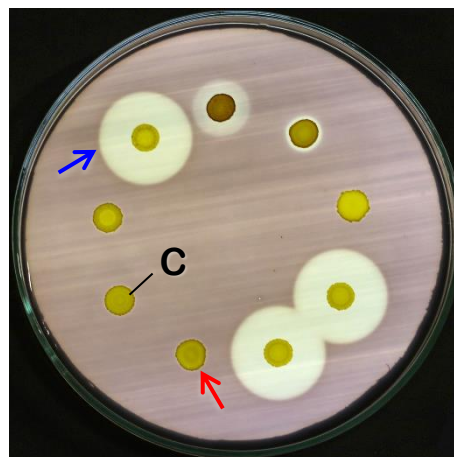
De acordo com a classificação obtida através do índice Pz (Tabela 3, Tabela 4), os níveis mais altos de produção foram obtidos para caseinase com 14 cepas agrupadas na categoria C (alta produção), enquanto a lipase agrupou o maior número de cepas na categoria B (produção moderada), totalizando 11 isolados.

Figura 9 – Triagem enzimática de *Bacillus* spp. em meio sólido



Nota: Para cada enzima, tem-se à esquerda uma visão geral da placa após revelação (ver APÊNDICE B) e à direita o detalhe do halo formado, indicativo de resultado positivo para atividade enzimática.
Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

Figura 10 – Interpretação dos resultados de detecção de atividade enzimática em meio sólido



Nota: As colônias (C) correspondem a diferentes isolados bacterianos que apresentaram capacidade de crescimento em meio de cultura contendo um substrato enzimático. As setas evidenciam exemplos de resultados positivos (azul: com formação de halos de hidrólise) e negativos (vermelho: ausência de halos de hidrólise) após revelação das placas (ver APÊNDICE B).
Fonte: Liany F. de A. Melo (2017)

Tabela 3 – Frequência de produção enzimática para *Bacillus* spp.

Enzimas	Não produtores (A)	Produtores Moderados (B)	Altos Produtores (C)	Total de produtores (B+C)
Amilase	7	5	7	12
Caseinase	2	3	14	17
Celulase	8	0	11	11
Esterase	1	7	11	18
Gelatinase	0	8	11	19
Lipase	8	11	0	11
Pectato Liase	7	2	10	12
Poligalacturonase	7	2	10	12

Legenda: (A) Valores de $P_z = 1$, sem atividade enzimática; (B) $0,63 < P_z < 1$, atividade enzimática moderada e (C) $P_z \leq 0,63$, forte atividade enzimática.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

Em todas as enzimas (exceto gelatinase), foi observado que algumas cepas apresentaram crescimento nos meios específicos sem que fosse detectada a presença de atividade enzimática (ausência de halos) (Figura 10), correspondendo à categoria A (não produtores) segundo o índice enzimático P_z (Tabela 3, Tabela 4, Figura 9, Figura 10). Esses resultados sugerem que, durante o período de observação, essas bactérias usaram uma fonte de nutriente alternativa em lugar de metabolizar o substrato enzimático fornecido.

Considerando-se apenas o grupo de cepas em que foi detectada produção enzimática (B+C), pode-se observar que os isolados *B. thuringiensis* BCLTHR-01 e *B. subtilis* BCLSUB-02, 03 e 04 foram os melhores produtores enzimáticos, com resultados positivos em todos os ensaios (oito enzimas) (Figura 11, Tabela 4).

Os isolados *B. subtilis* BCLSUB-01, *B. licheniformis* BCLLNF-03 e 04 e *B. halosaccharovorans* BCLHSC-01 produziram sete enzimas, enquanto os isolados *B. licheniformis* BCLLNF-01 e 02, *B. frigoritolerans* BCLFRG-01 e *B. oceanisediminis* BCLOCE-01 produziram seis enzimas cada. Por fim, todos isolados pertencentes às espécies *B. xiamenensis* (BCLXMN-01 a 04) e *B. altitudinis* (BCLALT-01 a 03) apresentaram o menor número de resultados positivos (quatro enzimas), não sendo capazes de produzir amilase, celulase, poligalacturonase e pectato liase (Figura 11, Tabela 4).

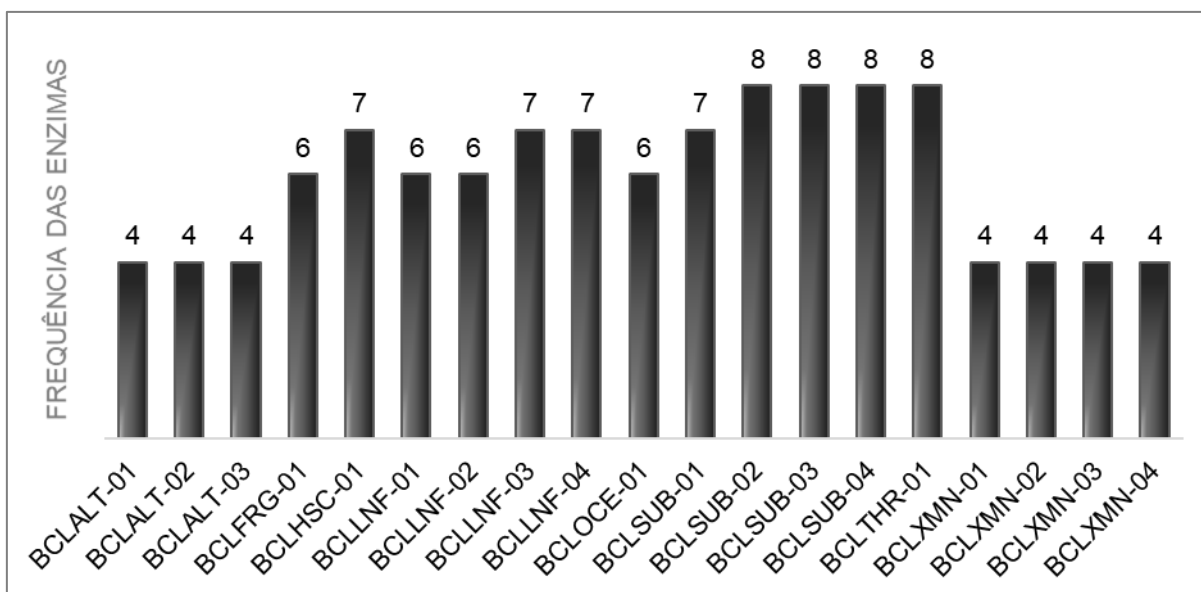
Tabela 4 – Atividade enzimática dos isolados de *Bacillus* spp. em meio sólido

Isolados	AML	CEL	EST	LIP	PGL	PLS	CAS	GLT
BCLALT-01	1,00 (A)	1,00 (A)	0,67 (B)	0,85 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,46 (C)	0,54 (C)
BCLALT-02	1,00 (A)	1,00 (A)	0,71 (B)	0,85 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,46 (C)	0,50 (C)
BCLALT-03	1,06 (A)	1,00 (A)	0,71 (B)	0,85 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,39 (C)	0,49 (C)
BCLFRG-01	0,75 (B)	0,58 (C)	0,53 (C)	1,00 (A)	0,45 (C)	0,47 (C)	1,00 (A)	0,73 (B)
BCLHSC-01	0,20 (C)	0,16 (C)	0,46 (C)	1,00 (A)	0,27 (C)	0,27 (C)	0,80 (B)	0,75 (B)
BCLLNF-01	0,60 (C)	0,16 (C)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,66 (B)	0,68 (B)	0,53 (C)	0,53 (C)
BCLLNF-02	0,38 (C)	0,23 (C)	0,67 (B)	1,00 (A)	0,33 (C)	0,31 (C)	1,00 (A)	0,73 (B)
BCLLNF-03	0,44 (C)	0,23 (C)	0,71 (B)	1,00 (A)	0,26 (C)	0,26 (C)	0,60 (C)	0,73 (B)
BCLLNF-04	0,45 (C)	0,23 (C)	0,72 (B)	1,00 (A)	0,28 (C)	0,25 (C)	0,60 (C)	0,71 (B)
BCLOCE-01	0,85 (B)	1,00 (A)	0,74 (B)	1,00 (A)	0,73 (B)	0,70 (B)	0,63 (B)	0,66 (B)
BCLSUB-01	0,81 (B)	0,23 (C)	0,53 (C)	1,00 (A)	0,51 (C)	0,42 (C)	0,46 (C)	0,61 (C)
BCLSUB-02	0,43 (C)	0,22 (C)	0,56 (C)	0,82 (B)	0,57 (C)	0,50 (C)	0,27 (C)	0,32 (C)
BCLSUB-03	0,65 (B)	0,26 (C)	0,43 (C)	0,88 (B)	0,36 (C)	0,35 (C)	0,44 (C)	0,64 (B)
BCLSUB-04	0,37 (C)	0,23 (C)	0,38 (C)	0,77 (B)	0,26 (C)	0,27 (C)	0,36 (C)	0,41 (C)
BCLTHR-01	0,78 (B)	0,22 (C)	0,55 (C)	0,74 (B)	0,29 (C)	0,35 (C)	0,73 (B)	0,78 (B)
BCLXMN-01	1,00 (A)	1,00 (A)	0,47 (C)	0,64 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,50 (C)	0,49 (C)
BCLXMN-02	1,00 (A)	1,00 (A)	0,47 (C)	0,77 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,37 (C)	0,50 (C)
BCLXMN-03	1,00 (A)	1,00 (A)	0,47 (C)	0,64 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,35 (C)	0,47 (C)
BCLXMN-04	1,00 (A)	1,00 (A)	0,46 (C)	0,77 (B)	1,00 (A)	1,00 (A)	0,42 (C)	0,44 (C)

Legenda: (AML) amilase, (CEL) celulase, (EST) esterase, (LIP) lipase, (PGL) poligalacturonase, (PLS) pectato liase, (CAS) caseinase e (GLT) gelatinase. Valores de $P_z = 1$ (A, preto): sem atividade enzimática, $0,63 < P_z < 1$ (B, vermelho): atividade enzimática moderada e $P_z \leq 0,63$ (C, azul): forte atividade enzimática.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

Figura 11 – Frequência de enzimas produzidas pelas cepas de *Bacillus* spp.



Fonte: Liany F. de A. Melo (2016).

Dentre as enzimas produzidas, proteases e esterases foram as mais frequentes, o que pode refletir uma adaptação dessas bactérias ao meio do qual foram inicialmente isoladas. Como mencionado anteriormente, o muco produzido por colônias de *P. caribaeorum* é rico em proteínas, lipídeos e carboidratos, fornecendo um meio seletivo para a adaptação metabólica dos isolados (BROWN; BYTHELL, 2005). Dessa forma, é de se esperar que as bactérias que vivem nesse microambiente sejam capazes de produzir enzimas para metabolizar tais substratos.

Embora seja conhecido que os representantes do gênero *Bacillus* são grandes produtores enzimáticos, essa produção não é uniforme ao se considerar as distintas espécies congêneras ou diferentes linhagens dentro de uma mesma espécie, como foi observado nos resultados para os isolados identificados como *B. licheniformis* (Figura 11). Já foi descrito, por exemplo, que bacilos isolados de diferentes fontes não produziam proteases ou esterases (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006; SPECIAN et al., 2016), enquanto outros trabalhos reportaram a presença de várias enzimas de cepas isoladas de ambientes termais (LENTINI; GUGLIANDOLO; MAUGERI, 2007).

Estes trabalhos sugerem que a produção de enzimas extracelulares nos micro-organismos é fortemente regulada ao nível de ecossistemas e por fatores ambientais (CUNHA et al., 2010). Em um estudo envolvendo bactérias marinhas isoladas de zonas costeiras (MÜHLING; JOINT; WILLETTS, 2013), foi verificado que tanto grupos de enzimas tidos como “principais” (*core enzymes*, essenciais à sobrevivência por

participar das vias do metabolismo primário) quanto enzimas mais “especialistas” (não essenciais, de caráter adaptativo a situações particulares do meio) variavam entre os diferentes isolados em decorrência do ambiente dos quais foram isolados (coluna d’água ou costões rochosos).

Da mesma forma, a distribuição enzimática pode ser controlada por fatores intrínsecos (ex.: genéticos) que influenciam, por exemplo, as interações ao nível de enzimas-substratos (CUNHA et al., 2010). O genoma de diferentes isolados possui um vasto número de genes codificadores de enzimas que podem apresentar sequências similares às aquelas já conhecidas ou serem completamente diversas como um resultado da deriva genética (AHARONI, 2009; BOLOTIN; HERSHBERG, 2016; KOSKINIEMI et al., 2012). Considerando-se a importância do manejo de energia nesses organismos unicelulares, a perda de genes pode ocorrer como um processo adaptativo às condições ambientais (KOSKINIEMI et al., 2012), resultando nos diferentes perfis enzimáticos exibidos por espécies filogeneticamente próximas.

Como discutido anteriormente, a competição no ambiente recifal por espaço e nutrientes atua como uma poderosa força seletiva que leva à necessidade de adaptação dos micro-organismos através da produção de sistemas enzimáticos multifatoriais que permitem sua sobrevivência nas condições adversas do meio marinho (SAMUEL; RAJA; PRABAKARAN, 2012). Dessa forma, o aprofundamento do conhecimento de cepas, vias metabólicas, moléculas e suas funções nas diversas interações ecológicas permitirão uma melhor compreensão do ambiente marinho para uso sustentável de seus recursos.

5.4 POTENCIAL DO ISOLADO BCLTHR-01 COMO BIOLARVICIDA CONTRA VETORES CULICÍDEOS

Dentre os bacilos marinhos isolados, a cepa *B. thuringiensis* BCLTHR-01 foi selecionada para investigar o potencial de aplicação como larvicida contra *A. aegypti*.

B. thuringiensis é uma bactéria esporulante capaz de produzir proteínas tóxicas na forma de cristais parasporais durante a fase de esporulação (LACEY, 2007) e que tem sido utilizada como uma das alternativas mais eficientes no controle biológico de populações de culicídeos (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000; USTA, 2013). Ao habitar ambientes diversificados como o ambiente marinho, esse micro-organismo sofre pressões ambientais diversas que podem refletir

em seu arsenal genético e proteico, tornando-o candidato em potencial na busca por novas linhagens com amplo espectro de atividade ou alto rendimento produtivo.

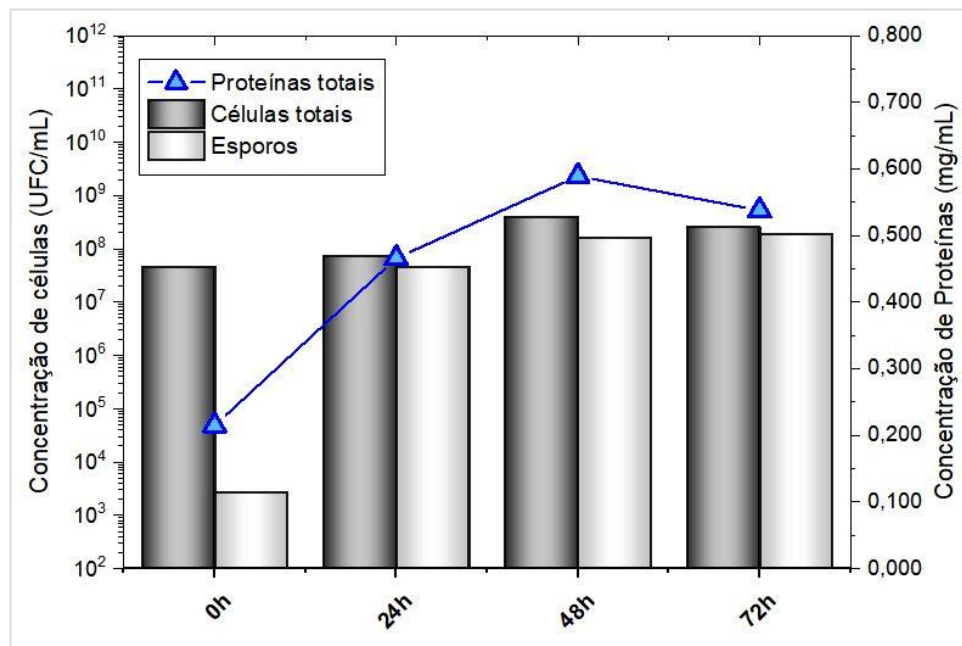
Entretanto, ao se utilizar linhagens naturais, é importante considerar a adequação dos componentes do meio e parâmetros de cultivo para garantir não apenas o desenvolvimento do micro-organismo, como também a produção das moléculas de interesse, sendo necessária a seleção de fontes alternativas de nutrientes e o desenvolvimento e a otimização de novos processos que contornem as limitações impostas pelas condições de fermentação já existentes (BHOWMIK, 2014; SOCCOL et al., 2009).

5.4.1 Produção da biomassa concentrada de BCLTHR-01 em biorreator

Em um ensaio piloto (dados não mostrados), foi verificado que BCLTHR-01 não apresentou um desenvolvimento satisfatório em meio de cultura contendo glicose, um carboidrato descrito como necessário para a produção adequada de esporos e toxinas por essa espécie (PEREIRA; MARTINS, 2016). Dessa forma, as fermentações seguintes foram realizadas utilizando o meio MBS no qual a fonte de carbono presente é o extrato de levedura, rico em aminoácidos, vitaminas do complexo B e minerais (GRANT; PRAMER, 1962; YAMADA et al., 2003), além de conter peptona de carne e sais minerais (APÊNDICE A). Já foi demonstrado que cultivos com *B. thuringiensis* em meios de cultura com elevados níveis iniciais de nitrogênio amino promovem não apenas uma elevada produção de biomassa e contagem de esporos, mas também favorecem a atividade larvicida (PRABAKARAN; HOTI, 2008).

O processo fermentativo empregado para o cultivo de BCLTHR-01 resultou na submissão de um pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o protocolo BR 10 2017 018249 5 (ANEXO A). Nas condições de fermentação determinadas, foi verificado que a maioria das células estavam esporuladas após 24h de incubação (Figura 12, Figura 13), atingindo a concentração máxima de células (10^8 UFC/mL) após 48h de cultivo (Tabela 5). Neste período também foi observada a ocorrência de lise celular e liberação de cristais no meio (Figura 13). A produção máxima de proteínas ocorreu após 48h de fermentação, atingindo valores de 0,589 mg/mL (Tabela 5, Figura 12).

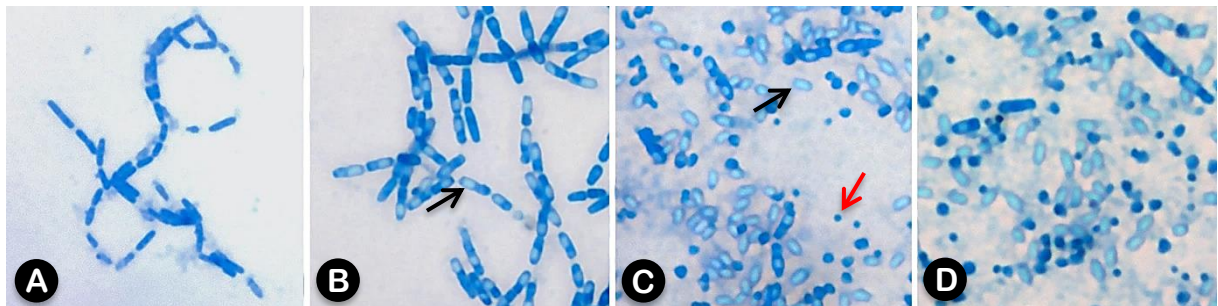
Figura 12 – Valores médios da concentração de células totais, de esporos viáveis e de proteínas para dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator



Nota: Fermentações realizadas em biorreator operando em batelada, a 30°C, 250 rpm, com aeração de 0,8 vvm e pH inicial de 7,2.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

Figura 13 – Fotomicrografias de amostras do cultivo de BCLTHR-01 em meio MBS após coloração com Azul de Coomassie



Legenda: (A) 0h: amostra coletada imediatamente após o semeio do meio, apresentando apenas células vegetativas; (B) 24h: a maioria das células apresentou esporos intracelulares (seta preta); (C) 48h: lise celular e liberação de esporos (seta preta) e cristais de toxinas (seta vermelha) no meio; (D) amostra coletada após 72h de cultivo.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017)

Resultados similares também foram observados por Pessanha (2008) que investigou a influência de diferentes composições de meios de cultura para o cultivo de *B. thuringiensis* var *israelenses* obtendo valores de contagem entre 10⁷ e 10⁸ UFC/mL para fermentações realizadas em frascos agitados após 33 a 42h de incubação com e sem presença de açúcares. Em uma fermentação realizada em biorreator (BIOSTAT B, B. Braun Biotech: 1,5 L de cultivo, 5% de inóculo, 30°C, 300

rpm, 0,33 vvm, pH 7,0) com meio composto apenas por extrato de levedura e solução de sais, foi observado que a contagem de células e esporos obtidos foi de 10^8 UFC/mL após 22h de fermentação, com a concentração de proteínas totais do complexo esporo-cristal próxima a 0,06 mg/mL.

Tabela 5 – Valores médios de contagem de células totais e esporos e concentração de proteínas para amostras de dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator

Amostra	Células totais (UFC/mL)	Esporos (UFC/mL)	Proteínas (mg/mL)
Caldo fermentado			
0h	$4,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^3$	0,215
24h	$7,2 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	0,466
48h	$4,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	0,589
72h	$2,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	0,537
Biomassa concentrada			
48h	$2,1 \times 10^9$	$6,1 \times 10^8$	5,844
72h	$1,5 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$	6,053

Nota: Fermentações realizadas em biorreator operando em batelada, a 30°C, 250 rpm, com aeração de 0,8 vvm e pH inicial de 7,2.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

De modo semelhante, Bhowmik (2014), trabalhando com *B. thuringiensis* var *kurstaki*, obteve a máxima contagem de esporos de 10^7 UFC/mL após 48h de fermentação em frasco agitado com meio desprovido de açúcares e composto por triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio, suplementado com farinha de soja desengordurada. Em fermentações em biorreator (BIO FLO 110 Fermentor, New Brunswick Scientific: 2 L de cultivo, 5% de inóculo, 30°C, 250 rpm, 30% oxigênio dissolvido, 1 vvm, pH 7,0, 36h) em meio contendo farinha de soja desengordurada, água marinha, cisteína e melaço, o autor obteve a máxima produção de esporos (10^9 UFC/mL) e de toxinas proteicas (2,3 mg/mL) após 24h de cultivo.

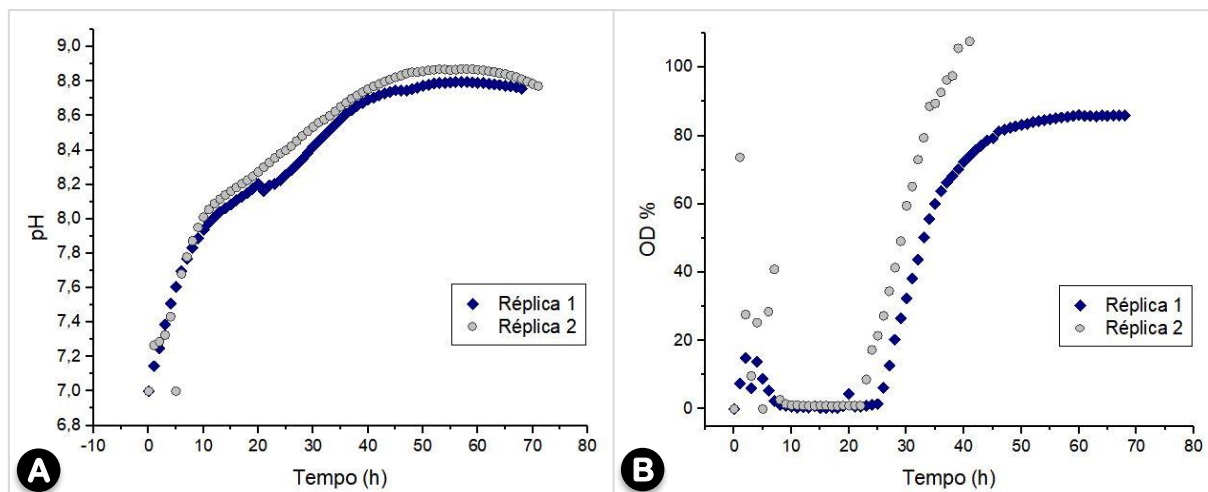
As curvas de acompanhamento cinético para pH e oxigênio dissolvido mostraram o perfil específico do crescimento da cepa BCLTHR-01 nas condições testadas (Figura 14).

Foi observado que há um aumento gradativo nos valores de pH ao longo da fermentação, os quais atingiram o equilíbrio aproximadamente após 40h de fermentação. Este perfil reflete um comportamento típico de fermentação realizada

em meio rico em compostos nitrogenados, cuja degradação resulta na formação de metabólitos básicos (principalmente liberação de amônia), que, juntamente com proteínas e outras moléculas produzidas pelo metabolismo microbiano, são responsáveis pela elevação dos níveis de pH (Figura 14A) (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001).

Por sua vez, os níveis de oxigênio dissolvido no meio diminuíram nas primeiras 10h de cultivo, quando atingiram os valores mínimos, voltando a aumentar após cerca de 24h de incubação (Figura 14B). Esses dados mostram que há uma alta demanda de oxigênio durante as primeiras 24h de cultivo, na qual ocorre a fase de multiplicação e manutenção da biomassa celular, conforme observado na (Figura 12). Quando as condições do meio provocam uma limitação no crescimento, o micro-organismo cessa a produção de biomassa e passa à fase de esporulação, em que há uma redução no consumo de oxigênio, visualizada pela elevação das taxas oxigênio dissolvido (Figura 14B) (PESSANHA, 2008).

Figura 14 – Variação de pH e de oxigênio dissolvido (OD) para dois cultivos de BCLTHR-01 em meio MBS realizados em biorreator



Nota: Fermentações realizadas em biorreator operando em batelada, a 30°C, 250 rpm, com aeração de 0,8 vvm e pH inicial de 7,2.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

Os dados acima sugerem que o crescimento e a produção de metabólitos por *B. thuringiensis* variam não apenas conforme a linhagem empregada, mas também em decorrência dos parâmetros utilizados, incluindo os recipientes em que são realizadas as fermentações (frascos ou biorreatores), valores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, níveis de aeração e agitação do cultivo (BHOWMIK, 2014;

PESSANHA, 2008).

Se por um lado o emprego de biorreatores permite o controle e o monitoramento de parâmetros importantes na padronização de processos para o desenvolvimento microbiano e produção das moléculas de interesse, por outro lado, a validação do método para emprego em outros modelos de biorreatores pode se apresentar como um desafio, requerendo um ajuste das condições estabelecidas, principalmente quando o metabolismo e necessidades nutricionais da cepa utilizada é desconhecido.

Em uma fermentação piloto realizada em um modelo diferente de biorreator (dados não mostrados), foi verificado que os cultivos de BCLTHR-01 apresentaram diferenças na contagem de células e taxas de esporulação. Uma vez que foram mantidos os mesmos parâmetros de cultivo nos dois biorreatores, a diferença dos resultados pode estar relacionada principalmente à agitação/oxigenação do meio, dependente de fatores como o tipo de propulsor, o formato, número e disposição das hélices dispersoras, o tipo chicana, bem como o tamanho das bolhas produzidas pelo sistema de aeração. Esses elementos precisam ser levados em conta nos processos de ajuste das condições de fermentação para garantir a padronização dos resultados.

5.4.2 Toxicidade de BCLTHR-01 para larvas de *A. aegypti*

A concentração da biomassa resultou em um rendimento de aproximadamente 13% do volume inicial de cultivo, com concentração de células em torno de 10^9 UFC/mL e valores de proteínas totais correspondendo a 5,844 mg/mL para 48h de cultivo e 6,053 mg/mL para 72h de cultivo (Tabela 5).

Os bioensaios de toxicidade para amostras de 48h de fermentação contra larvas de *A. aegypti* resultaram em valores de 0,849 ppm (com intervalo de 0,792 a 0,900 ppm) para CL₅₀ e de 1,285 ppm (com intervalo de 1,190 a 1,434 ppm) para CL₉₀. Esses resultados se apresentaram mais elevados que os valores para o padrão liofilizado IPS-82 do Instituto Pasteur fornecidos pelo CPqAM/FIOCRUZ (Tabela 6), indicando uma menor potência do produto testado.

Balakrishnan e colaboradores (2015) realizaram um cultivo com uma cepa marinha de *B. thuringiensis* em meio contendo glicose, peptona, extrato de carne, extrato de levedura e sais em frasco agitado para produção de toxinas. Os bioensaios contra larvas L₃ de *A. aegypti* resultaram em valores de 2,356 µL/mL para CL₅₀ e de 5,278 µL/mL para CL₉₀. Geetha e colaboradores (2007) realizaram fermentações com

B. thuringiensis subsp. *israelenses/tochigiensis* no mesmo meio de cultura e obtiveram resultados de 7,5 ng/mL para CL₅₀ e de 28 ng/mL para CL₉₀ nos bioensaios contra larvas L₃ de *A. aegypti*.

Tabela 6 – Atividade biológica da amostra de 48h da biomassa concentrada de BCLTHR-01 e do padrão IPS-82 contra larvas de *Aedes aegypti*

Amostra	Letalidade	Concentração (ppm)	Intervalo (ppm)
BCLTHR-01	CL ₅₀	0,849	0,792 a 0,900
	CL ₉₀	1,285	1,190 a 1,434
IPS-82	CL ₅₀	0,012	—
	CL ₉₀	0,021	—

Nota: Toxicidade determinada com base na concentração letal capaz de eliminar 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) dos indivíduos expostos (intervalo de confiança 95%). Os valores para o padrão IPS-82 foram fornecidos pelo CPqAM/FIOCRUZ.

Fonte: Liany F. de A. Melo (2017).

As diferenças entre os resultados encontrados no presente trabalho e aqueles citados acima podem estar relacionados, em um primeiro momento, aos vários sorotipos existentes para a mesma espécie e que podem apresentar diferentes níveis de toxicidade para o mesmo vetor (GEETHA et al., 2007). Além disso, larvas L₄ de *A. aegypti* são mais resistentes às toxinas de *B. thuringiensis* quando comparadas às demais fases larvais (SOCCOL et al., 2009), o que pode ter contribuído para a obtenção de valores mais altos de concentrações letais para a cepa marinha.

A grande vantagem da produção de biolarvicidas em processos fermentativos sem adição de carboidratos é a facilitação das etapas seguintes de preparo de formulados a partir da biomassa concentrada. A presença de glicose não metabolizada no cultivo traz algumas limitações, pois ela pode caramelizar em processos que envolvem calor, dificultando as etapas de biosseparação e de secagem do material, além de favorecer a contaminação dos formulados, reduzindo a durabilidade dos produtos gerados.

As condições de cultivo da cepa BCLTHR-01 para produção de biolarvicidas ainda precisam ser otimizadas. O conhecimento sobre os fatores que afetam diretamente o crescimento e o metabolismo desse isolado marinho permitirão otimizar as condições de produção das moléculas bioativas de interesse, com perspectivas para melhoramento dos resultados de toxicidade observados.

6 CONCLUSÃO

Os esforços para a obtenção de bactérias marinhas heterotróficas associadas ao muco de *P. caribaeorum* permitiram a obtenção de 281 isolados, dos quais 55 puderam ser liofilizados e identificados com sucesso. A dificuldade de manutenção desses micro-organismos foi decorrente principalmente do desconhecimento de suas necessidades nutricionais e fisiológicas, importantes no desenvolvimento de condições adequadas para o cultivo e a preservação dessas cepas.

A identificação molecular dos isolados mostrou que a comunidade bacteriana associada ao zoantídeo foi representada por 18 espécies distintas, com predominância do filo Firmicutes, que apresentou o gênero *Bacillus* como o mais abundante. De forma geral, esses bacilos se apresentaram como bons produtores enzimáticos em meio sólido, principalmente os isolados identificados como *B. thuringiensis* e *B. subtilis*. Proteases e esterases foram as enzimas mais frequentemente encontradas, sugerindo uma adaptação dessas bactérias ao micro-habitat fornecido pelo muco do cnidário marinho, rico em proteínas, lipídeos e carboidratos.

Foi demonstrado também que o isolado *B. thuringiensis* BCLTHR-01 apresentou atividade larvívora contra *A. aegypti*, sendo desenvolvido um processo fermentativo em biorreator operando em batelada com meio de cultura desprovido de glicose para a obtenção da biomassa tóxica da cepa marinha. A ausência de glicose representa uma grande vantagem em relação aos processos já existentes, uma vez que facilita as etapas para o preparo de formulações e a manutenção da integridade dos produtos gerados.

Outro potencial biotecnológico identificado nos isolados bacterianos marinhos foi a produção de pigmentos, cuja principal função atribuída é a proteção contra radiação solar. A identificação e caracterização desses metabólitos permitirá a realização de estudos para investigar a possibilidade de aplicação dessas moléculas no desenvolvimento de protetores solares. Além disso, muitos dos pigmentos oriundos de bactérias marinhas apresentam uma série de atividades farmacológicas, como antimicrobianas, citotóxicas, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias, etc., que despertam o interesse para investigação do uso dessas moléculas como agentes terapêuticos.

As investigações com metabólitos bacterianos provenientes de *P. caribaeorum*

ainda estão em sua fase inicial. O conhecimento sobre os fatores que afetam diretamente o crescimento e o metabolismo desses micro-organismos permitirão otimizar as condições de produção das moléculas bioativas de interesse.

Com essas informações, espera-se contribuir para o conhecimento das relações ecológicas e do papel dessas bactérias para a manutenção da integridade dos ecossistemas marinhos, além de fornecer dados sobre cepas e moléculas bioativas que venham a fortalecer o investimento em pesquisas em biotecnologia marinha no Estado.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. Disease in Zoanthids: dynamics in space and time. **Hydrobiologia**, v. 460, n. 1, p. 113-130, 2001. DOI: 10.1023/A:1013135702430.
- AHARONI, A. Mining for new enzymes. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 128-156, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00090.x.
- AIYER, P. V. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1525-1529, 2005.
- AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7.
- ALBRIZIO, S.; CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; PAWLIK, J. R. Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the caribbean sponge *Amphimedon compressa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 647-652, 1995. DOI: 10.1021/np50119a002.
- ALMEIDA, M. T. R.; MORITZ, M. I. G.; CAPEL, K. C. C.; PÉREZ, C. D.; SCHENKEL, E. P. Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 446-467, 2014. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.05.002.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: Review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118.
- ANWAR, M. A.; CHOI, S. Gram-negative marine bacteria: Structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2485-2514, 2014. DOI: 10.3390/md12052485.
- ARMSTRONG, E.; YAN, L.; BOYD, K. G.; WRIGHT, P. C.; BURGESS, J. G. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. **Hydrobiologia**, v. 461, p. 37-40, 2001.
- AROTSKER, L.; SIBONI, N.; BEN-DOV, E.; KRAMARSKY-WINTER, E.; LOYA, Y.; KUSHMARO, A. *Vibrio* sp. as a potentially important member of the Black Band Disease (BBD) consortium in *Favia* sp. corals. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, n. 3, p. 515-524, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00770.x.
- ATKINSON, M. R.; WRAY, L. V.; FISHER, S. H. Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 4758-4765, 1990.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X. H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine

vertebrates and invertebrates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 119-124, 2006. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.

BALAKRISHNAN, S.; INDIRA, K.; SRINIVASAN, M. Mosquitocidal properties of *Bacillus* species isolated from mangroves of Vellar estuary, Southeast coast of India. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 385-392, 2015. DOI: 10.1007/s12639-013-0371-9.

BALAKRISHNAN, S.; SANTHANAM, P.; SRINIVASAN, M. Larvicidal potency of marine actinobacteria isolated from mangrove environment against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 387-394, 2017. DOI: 10.1007/s12639-016-0812-3.

BALAN, S. S.; NETHAJI, R.; SANKAR, S.; JAYALAKSHMI, S. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, Supplement, p. S1811-S1816, 2012. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60500-0.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.-P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.

BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. **The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996. 632 p.

BHATNAGAR, I.; KIM, S.-K. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2673-2701, 2010. DOI: 10.3390/md8102673.

BHOWMIK, A. **Development of a cost effective medium for enhanced production of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin**. 2014. 111 f. Dissertação (Biotechnology Program) - Department of Mathematics & Natural Sciences, BRAC University, Bangladesh, 2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 160-258, 2014. DOI: 10.1039/C3NP70117D.

BOLOTIN, E.; HERSHBERG, R. Bacterial intra-species gene loss occurs in a largely clocklike manner mostly within a pool of less conserved and constrained genes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35168, 2016. DOI: 10.1038/srep35168.

BONAR, D. B.; WEINER, R. M.; COLWELL, R. R. Microbial-invertebrate interactions and potential for biotechnology. **Microbial Ecology**, v. 12, p. 101-110, 1986.

BOOPATHY, N. S.; KATHIRESAN, K. Anticancer drugs from marine flora: An overview. **Journal of Oncology**, v. 2010 (Artigo 214186), p. 1-18, 2010. DOI: 10.1155/2010/214186.

BOURNE, D. G.; GARREN, M.; WORK, T. M.; ROSENBERG, E.; SMITH, G. W.; HARVELL, C. D. Microbial disease and the coral holobiont. **Trends in Microbiology**,

v. 17, n. 12, p. 554-562, 2009. DOI: 10.1016/j.tim.2009.09.004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.

BROWN, B. E.; BYTHELL, J. C. Perspectives on mucus secretion in reef corals. **Marine Ecology Progress Series**, v. 296, p. 291-309, 2005.

CAMPOS, F. F. **Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) do litoral sul de Pernambuco**. 2011. 73 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.

CAMPOS, F. F.; GARCIA, J. E.; LUNA-FINKLER, C. L.; DAVOLOS, C. C.; LEMOS, M. V. F.; PÉREZ, C. D. *Alcanivorax dieselolei*, an alkane-degrading bacterium associated with the mucus of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 431-434, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.16113.

CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1624-1624, 2013. DOI: 10.1038/srep01624.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353-359, 2006. DOI: 10.1590/S1516-89132006000400001.

CASTRO, A. P.; ARAÚJO, S. D.; REIS, A. M. M.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G.; RODRIGUES, T. B.; THOMPSON, F. L.; KRÜGER, R. H. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 658-667, 2010. DOI: 10.1007/s00248-010-9646-1.

CERVINO, J. M.; HAYES, R. L.; POLSON, S. W.; POLSON, S. C.; GOREAU, T. J.; MARTINEZ, R. J.; SMITH, G. W. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in caribbean corals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6855-6864, 2004. DOI: 10.1128/aem.70.11.6855-6864.2004.

CESKA, M. Enzymatic catalysis in solidified media. **European Journal of Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01531.x.

CHALKIADAKIS, E.; DUFOURCQ, R.; SCHMITT, S.; BRANDILY, C.; KERVAREC, N.; COATANE, D.; AMIR, H.; LOUBERSAC, L.; CHANTEAU, S.; GUEZENNEC, J.;

- DUPONT-ROUZEYROL, M.; SIMON-COLIN, C. Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov., from New Caledonia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 6, p. 1702-1712, 2013. DOI: 10.1111/jam.12184.
- CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. Suppl. 1, p. 201-206, 2000. DOI: 10.1590/S0074-02762000000700034.
- CHATTERJEE, S.; HALDAR, S. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. S1, p. 002, 2012. DOI: 10.4172/2155-9910.S1-002.
- CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C. C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1818-1826, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04149.x.
- CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; THOMPSON, C. C.; MARTINS, R. C. R.; RAMOS, H. B.; THOMPSON, F. L. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 312-319, 2008. DOI: 10.1016/j.syapm.2008.06.001.
- CHUDAKOV, D. M.; MATZ, M. V.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103-1163, 2010. DOI: 10.1152/physrev.00038.2009.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.
- COSTA, S. L. A. **Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum***. 2013. 56 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2013.
- COUTINHO, R. Bentos de costões rochosos. In: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. C. (Eds.). **Biologia marinha**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. cap. 8, p. 147-157.
- CUNHA, A.; ALMEIDA, A.; COELHO, F. J. R. C.; GOMES, N. C. M.; OLIVEIRA, V.; SANTOS, A. L. Bacterial extracellular enzymatic activity in globally changing aquatic ecosystems. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. v. 1. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. cap. 15, p. 124-135.
- DAMIEN, E.; REVELL, P. A. Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications. **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 2, n. 2, p. 65-73, 2004.

DE BARJAC, H.; LARGET-THIÉRY, I. Characteristics of IPS-82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. **WHO Mimeograph Document, VBC/84.892, Geneva, Switzerland**, 1984.

DE FARIAS, F. M. C. GFP: uma ferramenta brilhante para a visualização da vida. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 2-8, 2008. DOI: 10.5935/1984-6835.20090002.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; LIN, W. E. N. H.; PROKSCH, P. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 544-563, 2010. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x.

DEBNATH, M.; PAUL, A. K.; BISEN, P. S. Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 253-260, 2007.

DOUGLAS, A. E. Coral bleaching—how and why? **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 385-392, 2003. DOI: 10.1016/S0025-326X(03)00037-7.

DRANCOURT, M.; ROUX, V.; FOURNIER, P.-E.; RAOULT, D. rpoB gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 497-504, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.2.497-504.2004.

DUCHASSAING DE FONBRESSIN, É. P.; MICHELOTTI, G. **Mémoire sur les coralliaires des Antilles**. Turin: L'imprimerie Royale, 1860. 89 p. Disponível em: <<https://ia800500.us.archive.org/23/items/mmoiresurlesco00duch/mmoiresurlesco00duch.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2014.

DURAK, M. Z.; FROMM, H. I.; HUCK, J. R.; ZADOKS, R. N.; BOOR, K. J. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. M50-M56, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08907.x.

FAULKNER, D. J.; GHISELIN, M. T. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 13, p. 295-301, 1983.

FEBY, A.; NAIR, S. Sponge-associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 330-337, 2010. DOI: 10.4236/abb.2010.14043.

FELING, R. H.; BUCHANAN, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 3, p. 355-357, 2003. DOI: 10.1002/anie.200390115.

FENNER, A. M.; GERWICK, W. H. Marine bioprospecting. In: OSBOURN, A.; GOSS, R. J.; CARTER, G. T. (Eds.). **Natural products: Discourse, diversity, and design**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2014. cap. 5, p. 85-102. DOI: 10.1002/9781118794623.ch5.

- FLOODGATE, G. D.; HAYES, P. R. The preservation of marine bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 1961. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1961.tb00237.x.
- GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 47, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0371-4.
- GEETHA, I.; PRABAKARAN, G.; PAILY, K. P.; MANONMANI, A. M.; BALARAMAN, K. Characterisation of three mosquitocidal *Bacillus* strains isolated from mangrove forest. **Biological Control**, v. 42, n. 1, p. 34-40, 2007. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2007.04.003.
- GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 800-806, 2013. DOI: 10.1007/s00248-012-0169-9.
- GIDDINGS, L.-A.; NEWMAN, D. J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 11, p. 1181-1210, 2013. DOI: 10.1007/s10295-013-1331-1.
- GOMES, A. S.; PAIVA, P. C.; SUMIDA, P. Y. G. Bentos de sedimentos não-consolidados. In: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. C. (Eds.). **Biologia marinha**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. cap. 7, p. 127-146.
- GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3272-3282, 2007. DOI: 10.1128/AEM.02811-06.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; ARSHAD, M. K. M.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1272193, 2017. DOI: 10.1155/2017/1272193.
- GRANT, C. L.; PRAMER, D. Minor element composition of yeast extract. **Journal of Bacteriology**, v. 84, n. 4, p. 869-870, 1962.
- GRANT, W. D.; LONG, P. E. The aquatic environment. In: _____. **Environmental Microbiology**. Glasgow: Blackie, 1981. cap. 2, p. 35-50.
- GRARD, G.; CARON, M.; MOMBO, I. M.; NKOGHE, D.; MBOUI ONDO, S.; JIOLLE, D.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C.; LEROY, E. M. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2681, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002681.
- GULDER, T. A. M.; MOORE, B. S. Chasing the treasures of the sea – bacterial marine natural products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 252-260, 2009. DOI: 10.1016/j.mib.2009.05.002.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)002713-2.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARPER, M. K.; BUGNI, T. S.; COPP, B. R.; JAMES, R. D.; LINDSAY, B. S.; RICHARDSON, A. D.; SCHNABEL, P. C.; TASDEMIR, D.; VANWAGONER, R. M.; VERBITSKI, S. M.; IRELAND, C. M. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. (Eds.). **Marine chemistry ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 3-69.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 51-56, 2013. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.04.009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

HAYGOOD, M. G.; SCHMIDT, E. W.; DAVIDSON, S. K.; FAULKNER, D. J. Microbial symbionts of marine invertebrates: Opportunities for microbial biotechnology. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 33-43, 1999.

HAYWICK, D. W.; MUELLER, E. M. Sediment retention in encrusting *Palythoa* spp. - a biological twist to a geological process. **Coral Reefs**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 1997.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 468-482, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.001.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128-150, 2005. DOI: 10.5483/BMBRep.2005.38.2.128.

JOINT, I.; MÜHLING, M.; QUERELLOU, J. Culturing marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 564-575, 2010. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x.

JOSHI, M.; NERURKAR, M.; BADHE, P.; ADIVAREKAR, R. Scouring of cotton using marine pectinase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 106-113, 2013. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.10.010.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008. DOI: 10.1007/s00284-008-9276-8.

KELLY, S. R.; JENSEN, P. R.; HENKEL, T. P.; FENICAL, W.; PAWLIK, J. R. Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 31, n. 2, p. 175-182, 2003. DOI: 10.3354/ame031175.

KEMP, D. W.; COOK, C. B.; LAJEUNESSE, T. C.; BROOKS, W. R. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 335, n. 2, p. 266-276, 2006. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.03.017.

KIM, S.-K. **Advances in food and nutrition research. Marine Medicinal Foods: Implications and applications - Animals and microbes**. 1. ed. v. 65. Waltham: Academic Press, 2012. 280 p.

KIRUTHIKA, J.; SARASWATHY, N. Production of L-glutaminase and its optimization from a novel marine isolate *Vibrio azureus* JK-79. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 50, p. 6944-6953, 2013. DOI: 10.5897/AJB2013.13107.

KOKKE, W. C. M. C.; EPSTEING, S.; LOOK, S. A.; RAU, G. H.; FENICAL, W.; DJERASSI, C. On the origin of terpenes in symbiotic associations between marine invertebrates and algae (Zooxanthellae). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 13, p. 8168-8173, 1984.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A.; VURRO, M.; MATHIEU, V.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, M.; VAN OTTERLO, W. A. L.; DASARI, R.; LEFRANC, F.; KISS, R. Towards a cancer drug of fungal origin. **Medicinal research reviews**, v. 35, n. 5, p. 937-967, 2015. DOI: 10.1002/med.21348.

KOSKINIEMI, S.; SUN, S.; BERG, O. G.; ANDERSSON, D. I. Selection-driven gene loss in bacteria. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002787, 2012. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002787.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. DOI: 10.4061/2011/280696.

KUMAR, D.; KUMAR, L.; NAGAR, S.; RAINA, C.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1763-1770, 2012.

LABOREL, J. Madréporaires et hydrocoralliaires récifaux des cotes brésiliennes: systématique, écologie, répartition verticale et géographique. **Annales de l'Institut Oceanographique**, v. 47, p. 171-229, 1970.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. sp2, p. 133-163, 2007. DOI: 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-148.

LENTINI, V.; GUGLIANDOLO, C.; MAUGERI, T. L. Identification of enzyme-producing thermophilic bacilli isolated from marine vents of Aeolian Islands (Italy). **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 355-361, 2007. DOI: 10.1007/BF03175073.

LINDSAY, J. A. Genomics of *Staphylococcus*. In: WIEDMANN, M.; ZHANG, W. (Eds.). **Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Springer, 2011. cap. 8, p. 237-265. DOI: 10.1007/978-1-4419-7686-4_8.

LIU, Y.; LAI, Q.; DONG, C.; SUN, F.; WANG, L.; LI, G.; SHAO, Z. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80097, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080097.

LOOK, S. A.; FENICAL, W.; JACOBS, R. S.; CLARDY, J. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 17, p. 6238-6240, 1986.

LOPES, S. P. **Desenvolvimento e caracterização de cápsulas probióticas contendo *Lactobacillus rhamnosus***. 2016. 101 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

LOZADA, M.; DIONISI, H. M. Microbial bioprospecting in marine environments. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin: Springer, 2015. cap. 11, p. 307-326.

LUNA, C. L. **Avaliação de técnicas de separação fluido-sólido na produção de bioinseticidas a partir de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2004. 202 f. Doutorado (Programa de Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (Coppe), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

LUNA, G. M. Biotechnological potential of marine microbes. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin: Springer, 2015. cap. 26, p. 651-662.

LUNA, G. M.; BIAVASCO, F.; DANOVARO, R. Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1851-1857, 2007. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01287.x.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y.; HATANO, T.; OHBA, M. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 418-422, 2000. DOI: 10.1007/s002840010080.

MAEDA, T.; FURUSHITA, M.; HAMAMURA, K.; SHIBA, T. Structures of ribonuclease P RNAs of *Vibrio* core species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, n. 2, p. 141-146, 2001. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10633.x.

MAGARLAMOV, T. Y.; MELNIKOVA, D. I.; CHERNYSHEV, A. V. Tetrodotoxin-producing bacteria: Detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 166, 2017. DOI: 10.3390/toxins9050166.

MANI, C.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; SUNDARAPANDIAN, S.; POOPATHI, S. Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* VCRC-B540 for mosquito control. **BioControl**, v. 60, n. 1, p. 71-79, 2015. DOI: 10.1007/s10526-

014-9605-8.

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1066-1101, 2014. DOI: 10.3390/md12021066.

MAYER, A. M. S. Marine pharmaceuticals: The clinical pipeline. 2017. Disponível em: <<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>>. Acesso em: 3 set. 2017.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSESTANI, N. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2510-2573, 2013. DOI: 10.3390/md11072510.

MCKEW, B. A.; TAYLOR, J. D.; MCGENITY, T. J.; UNDERWOOD, G. J. C. Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. **The ISME journal**, v. 5, n. 1, p. 30-41, 2011. DOI: 10.1038/ismej.2010.91.

MEIKLE, P.; RICHARDS, G. N.; YELLOWLEES, D. Structural investigations on the mucus from six species of coral. **Marine Biology**, v. 99, p. 187-193, 1988.

MELO, L. F. A.; CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, L. L. D. S. S.; MODESTO, J. C. A.; PÉREZ, C. D. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 145-151, 2012. DOI: 10.5007/2175-7925.2012v25n3p145.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010. DOI: 10.1016/j.micres.2009.09.005.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; SREE, A. Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. **Acta Biotechnologica**, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2003. DOI: 10.1002/abio.200390011.

MORADI, M.; XIAO, T.; SONG, Z. Investigation of corrosion inhibitory process of marine *Vibrio neocaledonicus* sp. bacterium for carbon steel. **Corrosion Science**, v. 100, p. 186-193, 2015. DOI: 10.1016/j.corsci.2015.07.030.

MUFFLER, K.; SANA, B.; MUKHERJEE, J.; ULBER, R. Marine enzymes – production and applications. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin: Springer, 2015. cap. 14, p. 413-430.

MÜHLING, M.; JOINT, I.; WILLETTS, A. J. The biodiscovery potential of marine bacteria: an investigation of phylogeny and function. **Microbial Biotechnology**, v. 6,

n. 4, p. 361-370, 2013. DOI: 10.1111/1751-7915.12054.

MUNN, C. B. Marine bacteria. In: _____. **Marine microbiology: Ecology and applications**. 2. ed. New York: Garland Science, 2011. cap. 4, p. 91-120.

NABAR, B. M.; LOKEGAONKAR, S. Larvicidal activity of microbial metabolites extracted from extremophiles against vector mosquitoes. **International Journal of Mosquito Research**, v. 2, n. 3, p. 161-165, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine Drugs**, v. 12, p. 255-278, 2014. DOI: 10.3390/md12010255.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013.

NOBRE, A. H. B.; MODESTO, J. C. A. Avaliação bioquímica e farmacológica do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (baba de boi). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE (CONIC), XVI., 2008, Recife. **Resumo expandido...** Disponível em: <<http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2008/conic/pibic/20/072101663SCPO.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2014.

OKAFOR, N. Production of microbial insecticides. In: _____. **Modern industrial microbiology and biotechnology**. Edenbridge: Science Publishers, 2007. cap. 17, p. 315-326.

ORDOÑEZ, O. F.; LANZAROTTI, E.; KURTH, D.; GORRITI, M. F.; REVALE, S.; CORTEZ, N.; VAZQUEZ, M. P.; FARÍAS, M. E.; TURJANSKI, A. G. Draft genome sequence of the polyextremophilic *Exiguobacterium* sp. Strain s17, isolated from hyperarsenic lakes in the Argentinian puna. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. e00480-13, 2013. DOI: 10.1128/genomeA.00480-13.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M. J.; DE LA ROSA-GARCÍA, S. D. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 346-352, 2010. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.02.007.

PANDE, S.; KOST, C. Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 349-361, 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2017.02.015.

PARROT, D.; ANTONY-BABU, S.; INTERTAGLIA, L.; GRUBE, M.; TOMASI, S.; SUZUKI, M. T. Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive Actinobacteria. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15839, 2015. DOI: 10.1038/srep15839.

PAULINO, G. V. B.; BROETTO, L.; PYLRO, V. S.; LANDELL, M. F. Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral *Palythoa caribaeorum* due to anthropogenic effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, n. 2, p. 1024-1030, 2017. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.039.

PAWLIK, J. R. Marine invertebrate chemical defenses. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 1911-1922, 1993.

PEIREN, J.; BUYSE, J.; DE VOS, P.; LANG, E.; CLERMONT, D.; HAMON, S.; BÉGAUD, E.; BIZET, C.; PASCUAL, J.; RUVIRA, M. A.; MACIÁN, M. C.; ARAHAL, D. R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3559-3571, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiology of natural waters, drinking water, and wastewater. In: _____. **Microbiology: An application based approach**. New Delhi: Tata McGraw Hill, 2010. cap. 29, p. 805-841.

PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. **Marine Drugs**, v. 8, p. 438-459, 2010. DOI: 10.3390/md8030438.

PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 714-734, 2016.

PESSANHA, L. G. **Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2008. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2008.

POOPATHI, S.; AHANGAR, N. A.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; PRABA, V. L.; MANI, C. Isolation and characterisation of a new mosquitocidal bacterium strain of *Enterobacter cloacae* VCRC-B519 from marine soil. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 158-169, 2014. DOI: 10.1080/09583157.2013.852652.

POOPATHI, S.; MANI, C.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; PRABA, V. L.; AHANGAR, N. A.; BALAGANGADHARAN, K. Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* for mosquito control. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 323-332, 2014. DOI: 10.1007/s00436-013-3658-y.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 961-965, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0370-5.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982. DOI: 10.1080/00362178285380031.

PRIMACK, R. B. Where is the world's biological diversity found? In: _____. **Essentials of conservation biology**. 5. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. cap. 3, p. 51-68. Disponível em: <http://www.sinauer.com/media/wysiwyg/samples/PrimackEssentials5e_Ch03.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2014.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – Current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 125-134, 2002. DOI: 10.1007/s00253-002-1006-8.

QUEVRAIN, E.; DOMART-COULON, I.; BOURGUET-KONDRACKI, M. Marine natural products – chemical defense/chemical communication in sponges and corals. In: OSBOURN, A.; GOSS, R. J.; CARTER, G. T. (Eds.). **Natural products: Discourse, diversity, and design**. 1. ed. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc, 2014. cap. 3, p. 39-66. DOI: 10.1002/9781118794623.ch3.

RABELO, E. F. **Diversidade de micro-organismos associados a zoantídeos (Cnidaria, Zoanthidae)**. 2012. 180 f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RABELO, E. F.; ROCHA, L. L.; COLARES, G. B.; BOMFIM, T. A.; NOGUEIRA, V. L. R.; KATZENBERGER, M.; MATTHEWS-CASCON, H.; MELO, V. M. M. *Symbiodinium* diversity associated with zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) in Northeastern Brazil. **Symbiosis**, v. 64, n. 3, p. 105-113, 2014. DOI: 10.1007/s13199-014-0308-9.

RAMI, M.; LUCA, T.; JOSHUA, T.; SCOTT, L.; IRENE, S. *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. **Veterinary microbiology**, v. 169, n. 0, p. 80-88, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.12.012.

RAVINDRAN, J.; KANNAPIRAN, E.; MANIKANDAN, B.; FRANCIS, K.; ARORA, S.; KARUNYA, E.; KUMAR, A.; SINGH, S. K.; JOSE, J. UV-absorbing bacteria in coral mucus and their response to simulated temperature elevations. **Coral Reefs**, v. 32, n. 4, p. 1043-1050, 2013. DOI: 10.1007/s00338-013-1053-x.

REID, S. J.; ABRATT, V. R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 312-321, 2005. DOI: 10.1007/s00253-004-1885-y.

REIS, A. M. M.; ARAÚJO JR, S. D.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS JR, G.; COELHO, A. M. A.; KRÜGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378-1387, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04106.x.

RESHEF, L.; KOREN, O.; LOYA, Y.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. The coral probiotic hypothesis. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 2068-2073, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01148.x.

ROCHA, J.; PEIXE, L.; GOMES, N. C. M.; CALADO, R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds — An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1860-1886, 2011. DOI: 10.3390/md9101860.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus*

thuringiensis subsp. *kurstaki*: A physiological study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 307-316, 2001. DOI: 10.1023/A:1016717428583.

SAMUEL, P.; RAJA, A.; PRABAKARAN, P. Investigation and application of marine derived microbial enzymes: Status and prospects. **International Journal of Oceanography and Marine Ecological System**, v. 1, p. 1-10, 2012. DOI: 10.3923/ijomes.2012.1.10.

SANA, B. Marine microbial enzymes: Current status and future prospects. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin: Springer, 2015. cap. 38, p. 905-918.

SANTOS, G. S.; BURGOS, D. C.; LIRA, S. M. A.; SCHWAMBORN, R. The impact of trampling on reef macrobenthos in northeastern Brazil: How effective are current conservation strategies? **Environmental Management**, v. 56, n. 4, p. 847-858, 2015. DOI: 10.1007/s00267-015-0552-7.

SASIDHARAN, R. S.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M. Biocompatible polyhydroxybutyrate (PHB) production by marine *Vibrio azureus* BTKB33 under submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 455-465, 2015. DOI: 10.1007/s13213-014-0878-z.

SAWABE, T.; OGURA, Y.; MATSUMURA, Y.; FENG, G.; AMIN, A. K. M. R.; MINO, S.; NAKAGAWA, S.; SAWABE, T.; KUMAR, R.; FUKUI, Y.; SATOMI, M.; MATSUSHIMA, R.; THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B.; CHRISTEN, R.; MARUYAMA, F.; KUROKAWA, K.; HAYASHI, T. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonus* sp. nov. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 414, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00414.

SCHMIDT, E. W. From chemical structure to environmental biosynthetic pathways: navigating marine invertebrate—bacteria associations. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 437-440, 2005. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.07.002.

SEEMANN, P.; GERNERT, C.; SCHMITT, S.; MEBS, D.; HENTSCHEL, U. Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 4, p. 405-411, 2009. DOI: 10.1007/s10482-009-9353-4.

SENTHIL, K. K.; MANOJ, V. G.; VUDAY, K. A.; ERROLLA, M.; LAKSHMI, K. D.; SOMA, S. C.; LAKSHMI, P. A. Industrially produced enzymes and their applications - An overview. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1069-1072, 2012.

SEO, J.-S.; KEUM, Y.-S.; LI, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 1, p. 278-309, 2009. DOI: 10.3390/ijerph6010278.

SERVIN, J. A.; HERBOLD, C. W.; SKOPHAMMER, R. G.; LAKE, J. A. Evidence excluding the root of the tree of life from the Actinobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 1, p. 1-4, 2008. DOI: 10.1093/molbev/msm249.

SHARIF, F.; ALAEDDINOĞLU, N. G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 227-229, 1988. DOI: 10.1007/BF01569580.

SHNIT-ORLAND, M.; KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 371-380, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00644.x.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957. DOI: 10.1007/BF02545855.

SILVA, J. F.; GOMES, P. B.; SANTANA, E. C.; SILVA, J. M.; LIMA, É. P.; SANTOS, A. M. M.; PÉREZ, C. D. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 985-996, 2015. DOI: 10.1590/0001-3765201520140475.

SMITH JR, H. L.; GOODNER, K. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. **Journal of Bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 662-665, 1958.

SOARES, C. L. S.; PÉREZ, C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S.; MELO, L. F. A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000400004.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R. D.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 299-303, 1999. DOI: 10.1590/S0001-37141999000400002.

SOCOL, C. R.; POLLON, T. E. V.; FENDRICH, R. C.; PROCHMANN, F. A.; MOHAN, R.; BLASKOWSKI, M. M. M.; MELO, A. L. D. A.; CARVALHO, C. J. B. D.; SOCOL, V. T. Development of a low cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. spe, p. 121-130, 2009. DOI: 10.1590/S1516-89132009000700017.

SPECIAN, V.; COSTA, A. T.; FELBER, A. C.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15027777.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998. DOI: 10.1590/S0101-20611998000400004.

STOLP, H.; STARR, M. P. Principles of isolation, cultivation, and conservation of bacteria. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRÜPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G. (Eds.). **The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification**

of bacteria. v. 1. Berlin: Springer, 1981. cap. 5, p. 135-175. DOI: 10.1007/978-3-662-13187-9_5.

SUZUKI, M.; NAKAGAWA, Y.; HARAYAMA, S.; YAMAMOTO, S. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1639-1652, 2001. DOI: doi:10.1099/00207713-51-5-1639.

TURK, T.; KEM, W. R. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. **Toxicon**, v. 54, p. 1031-1037, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.06.031.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200028.

UNIVERSITÄT TÜBINGEN. DNA isolation from *Bacillus* / other bacteria. 2006. Disponível em: <http://www.uni-tuebingen.de/fileadmin/Uni_Tuebingen/Fakultaeten/Biologie/Institut_fuer_Evolution_und_Oekologie/Evolutionsoekologie_der_Tiere/Dokumente/research/methods/DNA_Isolation_180706.pdf>.

USTA, C. Microorganisms in biological pest control — a review (bacterial toxin application and effect of environmental factors). In: SILVA-OPPS, M. (Ed.). **Current Progress in Biological Research**. Rijeka: InTech, 2013. cap. 13. DOI: 10.5772/55786.

VAN LEEUWENHOEK, A. **Alle de brieven. Deel 2: 1676-1679**, 1676. Disponível em: <http://www.dbnl.org/tekst/leeu027alle02_01/leeu027alle02_01.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2014.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x.

VASCONCELOS, T. L. **Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica das proteínas presentes no muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa)**. 2011. 81 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biologia Animal) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

VELHO-PEREIRA, S.; PARVATKAR, P.; FURTADO, I. J. Evaluation of antioxidant producing potential of halophilic bacterial bionts from marine invertebrates. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 2, p. 183-189, 2015.

VILELA, W. F. D.; FONSECA, S. G.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; NITSCHKE, M. Production and properties of a surface-active lipopeptide produced by a new marine *Brevibacterium luteolum* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2245-2256, 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-

1208-4.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; KATHARIOU, S.; TIEDJE, J. M. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 541-555, 2009. DOI: 10.1007/s00792-009-0243-5.

VOLBEHR, U.; RACHOR, E. The association between the caprellid *Pariambus typicus* Krøyer (Crustacea, Amphipoda) and ophiuroids. **Hydrobiologia**, v. 355, n. 1, p. 71-76, 1997. DOI: 10.1023/A:1003002817720.

WAHL, M.; GOECKE, F.; LABES, A.; DOBRETISOV, S.; WEINBERGER, F. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 3 (Artigo 292), p. 1-21, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00292.

WATERS, A. L.; HILL, R. T.; PLACE, A. R.; HAMANN, M. T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 780-786, 2010. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.09.013.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, 2005. 41 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2017.

WU, J.-L.; LU, J.-K. Marine microbial biosurfactins. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin: Springer, 2015. cap. 64, p. 1387-1404.

XIONG, L.; LI, J.; KONG, F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 32-37, 2004. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01437.x.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003. DOI: 10.1590/S1415-52732003000400006.

YIAGNISIS, M.; ATHANASSOPOULOU, F. Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece. In: ARAL, F.; DOĞU, Z. (Eds.). **Recent Advances in Fish Farms**. Rijeka: InTech, 2011. cap. 10, p. 153-168. DOI: 10.5772/27674.

YOSHIZAWA, S.; KARATANI, H.; WADA, M.; KOGURE, K. *Vibrio azureus* emits blue-shifted light via an accessory blue fluorescent protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 329, n. 1, p. 61-68, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02507.x.

ZARA, A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016. DOI: 10.5123/s1679-49742016000200017.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: Status and prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920-1934, 2010. DOI: 10.3390/md8061920.

APÊNDICE A – Composição dos meios de cultura utilizados

Caldo/Ágar Marinho Zobell modificado, pH 7,6

Meio utilizado para isolamento e cultivo das bactérias heterotróficas marinhas

5 g de peptona de carne, 1 g de extrato de levedura, 40 g de sal marinho Tropic Marin®, 1000 mL de água destilada. Adicionar 15 g de ágar para meio sólido.

Caldo MBS, pH 7,2

*Meio utilizado para esporulação dos isolados marinhos de *Bacillus* spp.*

10 g de peptona de carne, 1 g de extrato de levedura, 1 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 0,1 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,01 g de sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,01 g de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1000 mL de água destilada.

Caldo/Ágar Nutriente (Himedia), pH 7,4

*Meio utilizado para cultivo e contagem dos isolados marinhos de *Bacillus* spp., bem como para triagem das atividades amilolítica e proteolítica (FEBY; NAIR, 2010; SMITH JR; GOODNER, 1958)*

5 g de peptona de carne, 1,5 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne, 5 g de cloreto de sódio (NaCl), 1000 mL de água destilada. Adicionar 15 g de ágar para meio sólido.

Ágar Celulose, pH 7,0

Meio utilizado para triagem de atividade celulolítica (KASANA et al., 2008, com modificações)

2 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 0,5 g de sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,5 g de cloreto de potássio (KCl), 10 g de papel de filtro de baixa gramatura (18 g/m^2) (p/v), 0,2 g de peptona de carne, 17 g de ágar, 1000 mL de água destilada.

Ágar Peptona, pH 7,4

Meio utilizado para triagem de atividade lipolítica e esterolítica (KUMAR et al., 2012; SIERRA, 1957)

10 g de peptona de carne, 5 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 10 g de polissorbato 20 (esterase) ou polissorbato 80 (lipase) (p/v), 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada.

Ágar Pectina, pH 5,0 (poligalacturonase) / pH 8,5 (pectato liase)

Meio utilizado para triagem da atividade pectolítica (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975)

Solução A: 1 g de extrato de levedura, 5 g de pectina cítrica, 15 g de ágar, 500 mL de água destilada. Ajustar para pH 5 ou 8,5 de acordo com a enzima selecionada. Autoclavar separadamente. **Solução B:** 2 g de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 4 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 6 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), 0,2 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 mg de cloreto de cálcio (CaCl_2), 10 µg de ácido bórico (H_3BO_3), 10 µg de sulfato de manganês (MnSO_4), 70 µg de sulfato de zinco (ZnSO_4), 50 µg de sulfato de cobre (CuSO_4), 10 µg de trióxido de molibdênio (MoO_3), 500 mL de água. Autoclavar separadamente.

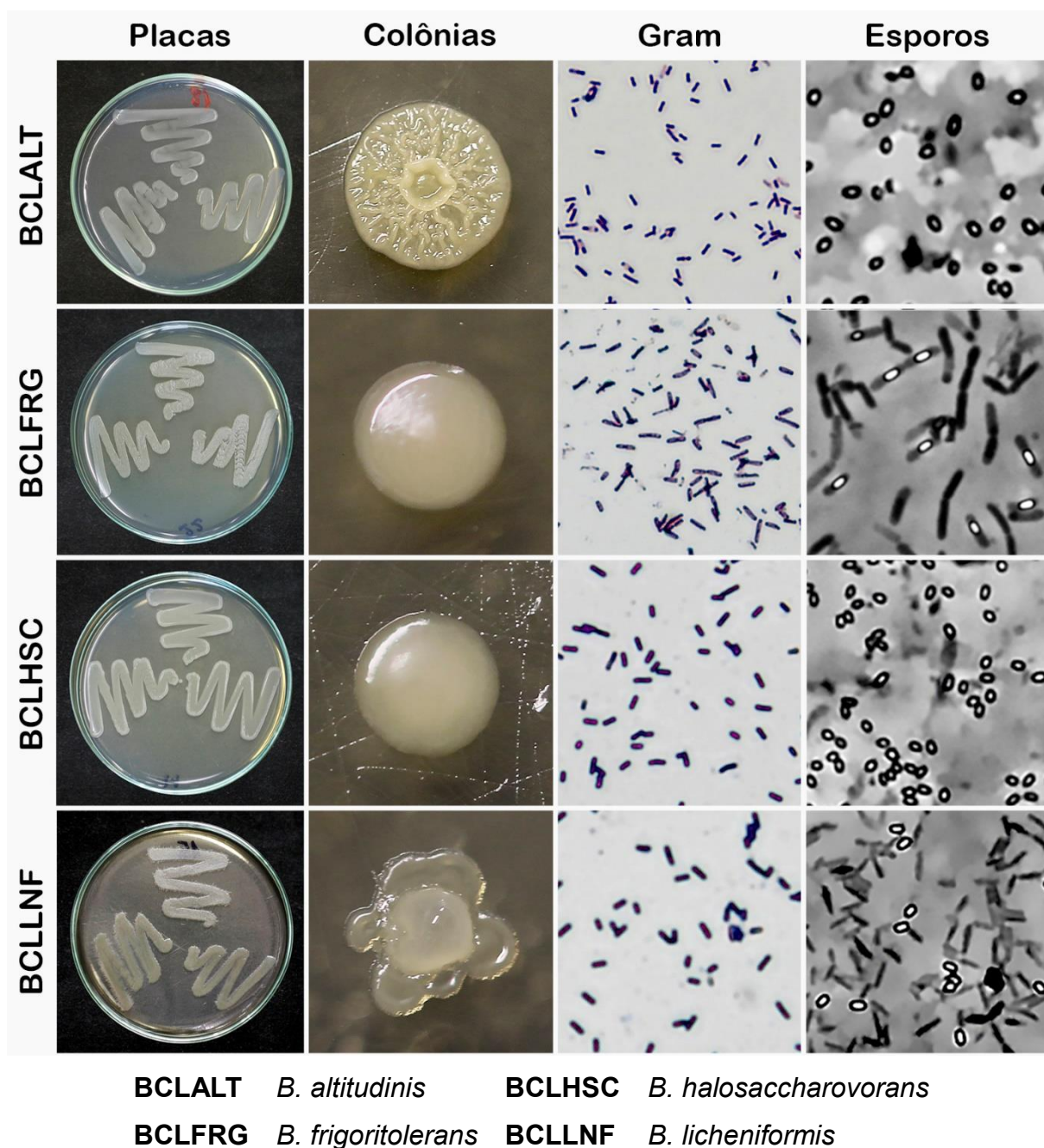
Preparar meio unindo soluções A e B estéreis e resfriadas a aproximadamente 42°C.

APÊNDICE B – Métodos de revelação para atividade enzimática

ENZIMAS	MÉTODOS DE REVELAÇÃO
Amilase (FEBY; NAIR, 2010) Celulase (KASANA et al., 2008) Pectinases (SOARES; SILVA; GOMES, 1999, com modificações)	Solução de Lugol¹ por cinco minutos Resultado positivo: zonas claras Resultado negativo: meio azul (amilase) ou avermelhado (celulase e pectinases) Princípio: A solução reage com o substrato inalterado presente no meio, que adquire uma coloração azul (amilase) ou avermelhada (celulase, pectinase). A presença de zonas claras em torno das amostras indica reação positiva para hidrólise.
Esterase e Lipase (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998)	Incubação a 4°C por 12h Resultado positivo: zonas de precipitação Resultado negativo: meio inalterado Princípio: A hidrólise do polissorbato promove a liberação de ácidos graxos que se ligam ao cálcio presente no meio. Este complexo passa a ser visualizado na forma de cristais insolúveis em torno das colônias, os quais são evidenciados após incubação a 4°C.
Proteases (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998)	Solução de ácido acético 5% por cinco minutos Resultado positivo: zonas claras Resultado negativo: meio opaco Princípio: A adição da solução ácida promove a precipitação das proteínas intactas, fazendo com que o meio adquira uma coloração mais opaca. A presença de zonas claras em torno das amostras indica reação positiva para hidrólise.

Notas: ¹ Composição: 1 g de iodo (I₂) + 2 g de iodeto de potássio (KI) + 297 mL de água destilada. Fonte: a autora (2016).

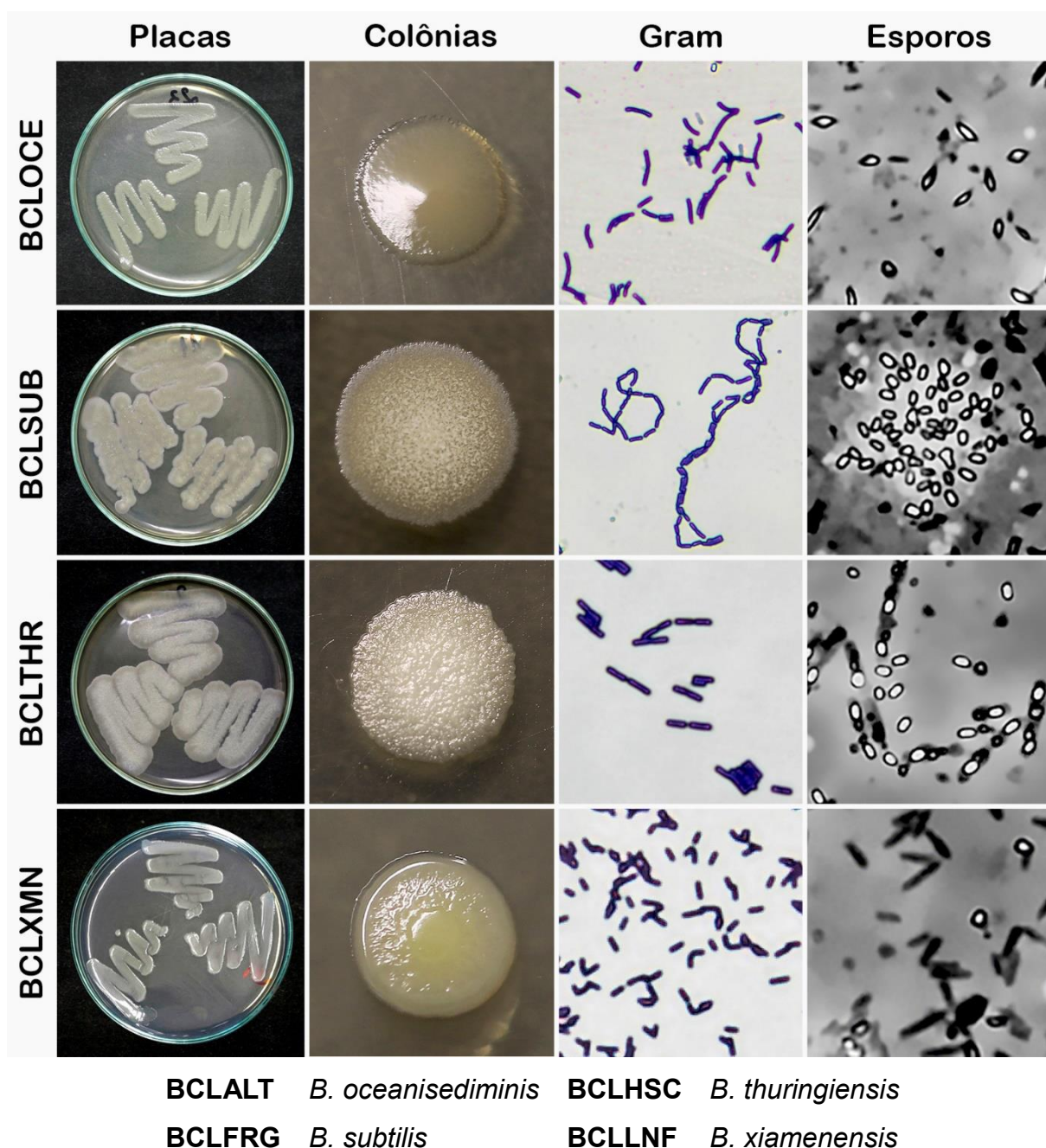
APÊNDICE C – Aspectos morfológicos dos isolados de *Bacillus* spp.



Legenda (da esquerda para a direita): aspecto morfológico das culturas em ágar nutriente após 24h de incubação; detalhe das colônias isoladas em meio sólido; coloração de Gram das culturas crescidas em caldo nutriente e fotomicrografia com contraste de fase mostrando esporos das culturas crescidas em meio MBS após 5 dias de incubação. Cada linha corresponde a um isolado marinho distinto.

Nota: As culturas foram fotografadas usando uma Canon EOS 70D acoplada à lente macro 100mm. Para as lâminas, foi empregado o microscópio Eclipse 80i acoplado à câmera Nikon DS Ri1, com aumento de 1000X para Gram e 800X com filtro Ph2 para contraste de fase.

(APÊNDICE C – Continuação)



Legenda (da esquerda para a direita): aspecto morfológico das culturas em ágar nutriente após 24h de incubação; detalhe das colônias isoladas em meio sólido; coloração de Gram das culturas crescidas em caldo nutriente e fotomicrografia com contraste de fase mostrando esporos das culturas crescidas em meio MBS após 5 dias de incubação. Cada linha corresponde a um isolado marinho distinto.

Nota: As culturas foram fotografadas usando uma Canon EOS 70D acoplada à lente macro 100mm. Para as lâminas, foi empregado o microscópio Eclipse 80i acoplado à câmera Nikon DS Ri1, com aumento de 1000X para Gram e 800X com filtro Ph2 para contraste de fase.

ANEXO A – Depósito do pedido de patente (INPI: BR 1020170182495)



25/08/2017 870170062389
13:00

00.000.2.2.16.0643742.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 018249 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA *Bacillus thuringiensis* BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*

Resumo: A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo fermentativo em meio líquido desprovido de carboidratos e realizado em biorreator para a produção de cristais de toxinas pela cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) com a finalidade de controle biológico de larvas do vetor *Aedes aegypti*.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/08/2017 às 13:00, Petição 870170062389

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: LIANY FIGUERÊDO DE ANDRADE MELO

CPF: 05137770400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua São Mateus, 207, Iputinga

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-600

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 781704

Fax:

Email: lianymelo@gmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: CHRISTINE LAMENHA LUNA FINKLER

CPF: 02380368473

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Amaro Lins de Andrade, 473, casa 23, Caixa Postal 190,
Campos do Jordão

Cidade: Gravatá

Estado: PE

CEP: 55640-675

País: BRASIL

Telefone: (81) 986 436651

Fax:

Email: chrislluna@yahoo.com.br

Inventor 3 de 4

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/08/2017 às 13:00, Petição 870170062389

Nome: CARLOS DANIEL PÉREZ

CPF: 01336987421

Nacionalidade: Argentina

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Antônio Valdevino Costa, 280, bloco 30, aptº 302, Cordeiro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50640-040

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 534918

Fax:

Email: cdperez@ufpe.br

Inventor 4 de 4

Nome: IVONE ANTÔNIA DE SOUZA

CPF: 09745610453

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Professora Anunciada da Rocha Melo, 70/1802, Madalena

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50710-390

País: BRASIL

Telefone: (81) 995 851904

Fax:

Email: idesouza5@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e Comp - COA 204.pdf
Relatório Descritivo	RD - COA 204.pdf
Reivindicação	REIV - COA 204.pdf
Resumo	RES - COA 204.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/08/2017 às 13:00, Petição 870170062389

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/08/2017 às 13:00, Petição 870170062389

1 / 6

RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA
Bacillus thuringiensis BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*.

Campo da Invenção

[001] A presente invenção enquadra-se no campo de produção de biolarvicidas para o controle de vetores culicídeos a partir de fermentação microbiana, mais particularmente, a produção de cristais proteicos de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Aedes aegypti*.

[002] São descritos os métodos de produção de endotoxinas por fermentação em biorreator usando-se a cepa marinha *B. thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) para a obtenção da biomassa concentrada ativa contra larvas de *A. aegypti*.

Antecedentes da Invenção

[003] A expressão “controle biológico” foi empregada pela primeira vez por Harry S. Smith em 1919 para indicar o uso de inimigos naturais no controle de insetos pragas em lavouras. Posteriormente, o termo passou a ser utilizado para referenciar todos os métodos de controle baseados no uso de organismos vivos (ou de substâncias por eles produzidas) como alternativa ao uso de produtos químicos que, além de promover o surgimento de linhagens resistentes, também são prejudiciais ao meio ambiente devido ao seu amplo espectro de ação (Akta et al., 2009. Interdiscip Toxicol, 2(1):1-12. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7).

[004] No campo da saúde pública, uma das pragas que tem ganhado destaque no cenário epidemiológico mundial é o mosquito *A. aegypti* (Diptera: Culicidae), conhecido por ser o vetor de arbovírus que causam Dengue, Chikungunya e Zika (Grard et al., 2014. PLoS Negl Trop Dis, 8(2):e2681, DOI: 10.1371/journal.pntd.0002681). Trata-se de uma espécie holometabólica, cujo ciclo de vida apresenta as fases de ovo, larva (L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e mosquito adulto. *A. aegypti* é uma espécie

2 / 6

predominantemente urbana que deposita seus ovos separadamente na parede interna de objetos localizados próximos à superfície de água limpa (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p). Ao entrarem em contato com a água acumulada no período de chuvas, os ovos eclodem e liberam as larvas (Beaty e Marquardt, 1996. The biology of disease vectors. Colorado: University Press of Colorado, 632p.). Uma vez que os criadouros (ex.: garrafas vazias, pneus, caixas d'água descobertas, vasos de plantas, bromélias, troncos de árvores) são difíceis de serem completamente eliminados do ambiente por questões naturais ou problemas de saneamento, os mesmos tornaram-se alvos para a aplicação de inseticidas (Ministério da Saúde, 1996. Plano diretor de erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil).

[005] Uma das alternativas mais eficientes para o controle biológico de populações desse vetor é o uso de bioinseticidas à base de diferentes micro-organismos (Charles et al., 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95(Supl. 1):201-206. DOI: 10.1590/S0074-02762000000700034), principalmente linhagens de *B. thuringiensis* (Bt), uma espécie de bactéria esporulante capaz de produzir proteínas tóxicas na forma de cristais parasporais (Usta, 2013. Cap. 13, p. 287-317, DOI: 10.5772/55786). Essas toxinas são altamente específicas ao inseto alvo, completamente biodegradáveis e não apresentam danos a seres humanos, vertebrados ou plantas. Uma vez ingeridas por larvas de insetos específicos, as toxinas são ativadas no intestino e passam a promover a necrose das células epiteliais, levando à morte (Bravo et al., 2006. Toxicon, 49(4):423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022).

[006] Vários esforços têm sido concentrados para o desenvolvimento de produtos de Bt para o controle de nematoides, lepidópteros, coleópteros e dípteros (Bravo et al., 2006. Toxicon, 49(4):423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022), objetivando-se a obtenção de produtos com custo reduzido e com alto rendimento. Dentre as várias abordagens empregadas, tem sido realizado o isolamento (ex.: "Novel *Bacillus thuringiensis* isolates active against dipteran pests", documento EP0480762A2) ou melhoramento genético de novas linhagens de Bt (ex.: "Microorganisms as pesticides",

3 / 6

documento EP0200344A2), o fornecimento de proteínas ou genes para produção de organismos transgênicos (ex.: "*Bacillus thuringiensis* α -endotoxin fragments", documento US5710020A; "Methods and compositions for expression of bti endotoxin", documento EP0153166A2; "*Bacillus thuringiensis* crystal polypeptides, polynucleotides, and compositions thereof", documento US7208474B2), bem como o desenvolvimento de formulações para aplicação em campo objetivando-se o controle de diferentes pragas de insetos (ex.: "Carrier and dispersal mechanism for a microorganic larvicide", documento US4187290A; "Insecticide composition for controlling insects which have an aquatic breeding site", documento US4707359A; "*Bacillus*-containing pesticide granules", documento US5283060A).

[007] A produção de endotoxinas é realizada por fermentação submersa utilizando um meio de cultura adequado, cuja composição pode variar de acordo com a linhagem bacteriana empregada.

[008] Na patente "Composição de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* e o respectivo processo de preparação" (documento PI 0003314-6 A), são descritos os processos para produção de formulados à base de fermentação utilizando um meio de cultura contendo amino-fétil, proteína de soja, ureia, manitol, cloreto de sódio e uma mistura de sais composta por $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ e $CaCl_2$. Da mesma forma, a patente "Processo de fabricação de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) e produto dele resultante" (documento PI 0002554-2 A) descreve o preparo de formulados a partir de fermentados de Bti em meio contendo peptona, glicose, KH_2PO_4 e os micronutrientes $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CaCl_2 \cdot 4H_2O$. Em ambos os casos, o meio de produção compreende fontes de nitrogênio, uma fonte de carbono (geralmente um açúcar) e micronutrientes. Para a cepa marinha BCLTHR-01, objeto da presente invenção, o desenvolvimento celular e a produção de cristais não ocorrem adequadamente em meios contendo glicose como fonte de carbono.

[009] A patente "Method for production of pesticide" (documento KR20110016693 (A)), por sua vez, relata a produção de um pesticida para o controle de lepidópteros à

4 / 6

base de fermentado *B. thuringiensis* serovar *colmeri* em meio contendo farelo de soja e leite desnatado, sendo mencionado também a produção de toxinas em meio LB acrescido de $MnSO_4$.

[010] As diferenças na composição dos meios de produção refletem as diferentes preferências nutricionais demonstradas pelas diversas linhagens. Além disso, o fato que espécies oriundas de ambientes diversificados, como o ambiente marinho, sofrem pressões ambientais diversas pode refletir em seu arsenal genético e proteico, tornando-as candidatas em potencial na busca por novas linhagens com amplo espectro de atividade ou alto rendimento produtivo.

[011] Ao se utilizar linhagens naturais, é importante considerar a adequação dos componentes do meio para garantir não apenas o desenvolvimento do micro-organismo, como também a produção das moléculas de interesse, sendo necessária a seleção de fontes alternativas de nutrientes e o desenvolvimento de novos processos que contornem as limitações impostas pelas condições de fermentação já existentes.

Descrição da Invenção

[012] A presente invenção descreve um processo para obtenção de uma biomassa concentrada formada principalmente por esporos e cristais de toxinas após fermentação líquida submersa em batelada realizada em biorreator para uma cepa marinha de Bt denominada BCLTHR-01, a qual apresenta propriedades biolarvícida contra *A. aegypti*. O emprego de biorreatores permite o controle e monitoramento de parâmetros importantes para o desenvolvimento microbiano e a produção de compostos de interesse, tais como variações de pH, temperatura e oxigênio dissolvido, bem como níveis de aeração e agitação do cultivo. O monitoramento detalhado dessas variáveis permite a reprodução precisa do método, sendo útil nos processos de otimização das condições de cultivo.

Etapa 1 – Obtenção do micro-organismo

[013] A cepa de Bt objeto da presente invenção foi isolada a partir do muco do zoantídeo marinho *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) através de plaqueamento em meio Ágar Marinho Zobell. As culturas puras foram analisadas por

5 / 6

microscopia de contraste de fase e então preservadas por liofilização usando um meio composto por 10% de sacarose e 1% de gelatina. A identificação foi realizada por sequenciamento do gene 16S rDNA, utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e do gene rpoB por uso dos iniciadores rpoB-F (5'-AARYTIGGMCCTGAAGAAAT-3') and rpoB-R (5'-TGIARTTTTTCATCAACCATGTG-3') (Durak et al 2006, *J Food Sci* 71:M50-M56).

Etapas 2 – Obtenção da biomassa concentrada ativa

[014] A cepa marinha *B. thuringiensis* BCLTHR-01 foi utilizada para a obtenção da biomassa concentrada ativa contra larvas de *A. aegypti*. O meio de cultura utilizado foi composto por (p/v): 1% de peptona de carne como fonte de nitrogênio, 0,1% de extrato de levedura como fonte de carbono e como micronutrientes 0,1% de KH_2PO_4 , 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,001% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,2 utilizando-se NaOH 5 M.

[015] Inicialmente, o inóculo da fermentação (proporção de 10%) foi preparado em dois frascos tipo Erlenmeyer (capacidade para 1 L) com concentração inicial de células na ordem de 10^6 unidades formadoras de colônias por mililitro de meio (UFC/mL), perfazendo um volume total de 150 mL de cultivo por frasco.

[016] Após incubação a 200 rpm por 16h a 30°C, o conteúdo dos frascos (com concentração de células totais em 10^7 UFC/mL) foi utilizado para inocular meio estéril em biorreator operando em batelada com capacidade nominal de 5 L e volume útil de 3 L. A fermentação foi realizada em duplicata por 48h a 30°C com vazão de ar de 0,8 vvm e agitação a 250 rpm. O nível de espuma foi controlado por adição de óleo vegetal como antiespumante

Etapas 3 – Métodos analíticos

[017] Monitoramento de pH e oxigênio → Durante todo o processo, o monitoramento das variáveis pH e oxigênio dissolvido foi realizado automaticamente pelo biorreator.

6 / 6

[018] Cinética de crescimento → A cada 24h, amostras foram coletadas para o acompanhamento do crescimento microbiano através da quantificação de células totais e esporos por plaqueamento de diluições das amostras antes e após choque térmico (80°C por 12min), respectivamente.

[019] Proteínas → As proteínas totais foram inicialmente precipitadas com acetona gelada (na proporção de 1:8) por 1h a -20°C e, em seguida, solubilizadas com NaOH 50 mM por 1h à temperatura ambiente. Após centrifugação (7467 x g, 10°C, 20min), o sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford (*Anal Biochem* 72:248-254, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

[020] Produção de toxinas → A produção de cristais de toxina foi monitorada diariamente através da análise de esfregaços dos caldos fermentados corados com Azul de Coomassie 0,25%. Após 48h de fermentação, os cristais foram extraídos segundo o método proposto por Mounsef e colaboradores (*J Microbiol Methods* 107:147-149, 2014) e quantificados por Bradford.

Etapas 4 – Avaliação da atividade larvicida contra A. aegypti

[021] Ao término da fermentação, a biomassa foi floculada com posterior sedimentação por até 24h a 4°C. Após descarte do sobrenadante, a biomassa concentrada foi submetida a bioensaios frente larvas L₄ de *A. aegypti* para determinação das concentrações letais para 50% (CL₅₀) das larvas segundo o método de Larget-Thiéry (VBC/84.892, WHO, 1984). A cepa IPS-82 do Instituto Pasteur foi utilizada como padrão.

[022] Nas condições propostas na presente invenção, o cultivo de BCLTHR-01 encontra-se totalmente esporulado após 24h de incubação, com lise celular e liberação de cristais parasporais após 48h. A contagem de células totais/esporos da biomassa concentrada ao término da fermentação fica em torno de 10⁹ UFC/mL, a qual apresenta boa atividade larvicida contra *A. aegypti*, com valores de CL₅₀ de 0,849 ppm (intervalo de 0,792 a 0,900).

1 / 1

REIVINDICAÇÕES

1. Processo fermentativo para produção de toxinas caracterizado por fermentação submersa em biorreator usando a cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 em um meio desprovido de carboidratos como fonte de carbono, que permite a obtenção de uma biomassa concentrada (10^9 UFC/mL) ativa contra larvas de *Aedes aegypti* (CL_{50} de 0,849 ppm, intervalo de 0,792 a 0,900).

1 / 1

RESUMO

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA
Bacillus thuringiensis BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*.

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo fermentativo em meio líquido desprovido de carboidratos e realizado em biorreator para a produção de cristais de toxinas pela cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) com a finalidade de controle biológico de larvas do vetor *Aedes aegypti*.