



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS – MBT**

**MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA ÀS ESPONJAS DE
ÁGUA DOCE DA AMAZÔNIA**

**Manaus
2012**

GLAUCIA CRISTINA MANÇO DA COSTA

**MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA ÀS ESPONJAS DE
ÁGUA DOCE DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da
Universidade do Estado do Amazonas,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: José Carlos Verle Rodrigues

Co-orientador: Aldo Rodrigues de Lima Procópio

Manaus

2012

Catálogo na fonte

Elaborada pela Bibliotecária Sônia Maria Nunes de Souza CRB-11ª 646

C837m Costa, Glaucia Cristina Manço da
Microbiota Bacteriana associada às esponjas de água doce da Amazônia / Glaucia Cristina Manço da Costa.
- Manaus: UEA, 2012.
51 fls.: il; 27cm.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. José Carlos Verle Rodrigues

1. Esponja 2. Bactéria 3. Biocatálise I. Título

CDU 579.61

DEDICATÓRIA

Dedico esta importante conquista às pessoas que mais amo: Pai Antônio, Mãe Aparecida e Marcos. Pelas angústias, preocupações que passaram por minha causa e pela dedicação a mim... Sem vocês, nada faz sentido... Com vocês, tudo é possível... Por vocês, tudo vale à pena... AMO VOCÊS...

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por essa oportunidade, pois sem a vontade do Pai nada seria possível.

Aos meus pais, Aparecida e Antonio, pois sem o apoio, compreensão, o carinho, o sustento e o incentivo, não teria conseguido chegar até o final. Amo vocês.

Ao meu namorado Marcos, pelo apoio que, principalmente nos finais de semana que cozinhou quando tinha que trabalhar no laboratório. Pelo incentivo que nos momentos de desespero ele não me deixava desistir. Pelo carinho e compreensão nos momentos de estresse. Obrigada. Te amo.

Ao professor Dr. José Carlos, pela oportunidade de orientação, pela paciência e pelo conhecimento.

Ao professor Dr. Aldo Procópio, pelo auxílio nas coletas, pela paciência, dedicação e carinho de ensinar as metodologias para realização desse trabalho, pois sem o senhor não teria conseguido. Muito obrigada.

As professoras, Helena Camarão, Hiléia Barroso, Antônia Queiroz, Sandra Zanotto e Luciana Boer, que pelos auxílios diretos ou indiretamente foram de suma importância para esse trabalho.

As minhas amigas e companheiras que me agüentam desde a graduação, Danielle Rachel, Daniele Lobo (com a Maria Fernanda) e Jaqueline Souza, pela amizade e apoio durante o mestrado, pois sem essa amizade não suportaria toda a pressão. Meninas, obrigada, amo vocês.

Aos colegas de laboratório Rafael Maciel, Manuela, Fábricia, Walber e Janaina. Obrigada pelo auxílio e apoio.

Aos técnicos de laboratório Bacellar e Fernando, pelo auxílio com os materiais e uso dos equipamentos.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização desse projeto.

O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.

Abraham Lincon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classes de enzimas. Adaptado de LEHNINGER (2011) e do sítio: http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/enzimas/enzimas-8.php . Acesso: 25/01/2012 as 17:00.....	19
Figura 2: Localização das coletas no município de Parintins. As setas indicam o local no mapa e as fotos ilustram o local onde a coleta das esponjas foi realizada.....	24
Figura 3: Localização das coletas no município de Manaus na comunidade Sem Terra e rio Tarumã.....	24
Figura 4: Parâmetros de configuração da programação dos equipamentos de análises.....	29
Figura 5. Imagem de colônias bactérias isoladas das esponjas e crescidas em meio de cultura sólido NA, depois de 24h de incubação.....	33
Figura 6: Frequência dos gêneros de bactérias isoladas de esponjas de água doce.	35
Figura 7: Cromatograma em CG-quiral dos padrões Acetofenona e Álcool racêmico.....	36
Figura 8: Cromatograma em CG-quiral da redução da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20330 (<i>Bacillus</i>), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM.....	36
Figura 9: Cromatograma em CG-quiral da redução da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20332. (<i>Bacillus</i>), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM	37

Figura 10: Cromatograma em CG-quiral da redução da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20334 (<i>Lysinibacillus</i>), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM	37
Figura 11: Representação do Cromatograma do CG-Massa. (A) pico majoritário referente a substancia obtida reação de biocatálise; (B) ampliação do pico majoritário presente no cromatograma; (C) estrutura sugerida pelo programa (nome do programa e biblioteca) do produto formado a partir da redução da <i>p</i> -nitroacetofenona obtida com a utilização de cepas de <i>Bacillus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Lysinibacillus</i>	38
Figura 12: Esquema de reação para a biorredução da <i>p</i> -nitroacetofenona utilizando bactérias.....	38
Figura 13: Representação do Cromatograma do CG-Massa do sinal da Acetofenona	39
Figura 14: Representação das moléculas utilizadas como substrato	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de isolados bacterianos provenientes dos diferentes locais e espécies de esponjas <i>Drullia browni</i> e <i>Metania reticulata</i>	31
Tabela 2: Características morfológicas e gêneros identificados de vinte e nove culturas de bactérias isoladas de esponjas de água doce de dois locais, Zé Açú e Costa Amazônia no município de Parintins/AM.....	32
Tabela 3. Identificação das bactérias isoladas a partir de esponjas de água doce com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.....	34

RESUMO

Esponjas são seres multicelulares pertencentes ao filo porífero, considerados metazoários mais primitivos. Apresentam uma estrutura celular sem tecidos verdadeiros. Vivem em oceanos tropicais, temperados e polares, e algumas espécies habitam a água doce. Possuem diversos hábitos de crescimento que englobam várias formas, cores e tamanhos podendo variar dependendo das condições ambientais. As esponjas permitem a formação de um microambiente dentro de seus tecidos, abrigando uma diversidade microbiana produtora de metabólitos secundários, representando um potencial na busca por novos compostos de interesse biotecnológico. O estudo ecológico dessas comunidades de microrganismos procura entender os processos de interação que ocorrem no ambiente. Bactérias são importante parte dos ecossistemas naturais, principalmente devido à sua variabilidade metabólica e à sua fisiologia adaptável. Biocatálise ou biotransformação é a técnica que utiliza catalisadores biológicos como, enzima ou o microrganismo diretamente para transformar um substrato. Essa técnica promove modificações químicas no substrato utilizando enzimas, isoladas ou pertencentes a microrganismos vivos, surgindo assim como uma tecnologia competitiva e que não agride o meio ambiente para fabricação de substâncias bioativas com elevado grau de pureza enantiomérica. O presente trabalho tem o objetivo de caracterizar bactérias associadas as esponjas de água doce provenientes de dois locais no Amazonas, com o intuito de identificar metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Foram realizadas duas coletas de esponjas no município de Parintins e no município de Manaus. As bactérias foram inoculadas e purificadas em meios seletivos. Foram realizadas as extrações de DNA e a identificação foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento de fragmento do rDNA 16S. Reação de bioredução foi realizada com três cepas bacterianas isoladas das esponjas sobre três substratos, *p*-nitroacetofenona, acetofenona e 3-hidroxi-2-metileno-3-(4'-nitrofenil)propanoato de metila. O progresso da reação foi monitorado por análise de Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de Massa (CG-MS). Foram obtidos 100 isolados das amostras coletadas no município de Parintins e 117 isolados no município de Manaus. Desses isolados, 31,5% foram identificados como sendo do gênero *Bacillus*. Na reação de bioredução, os três tipos de bactérias mostraram o mesmo tempo de retenção (13 minutos), essa redução foi identificada como quimiosseletiva, pois as bactérias reduziram o grupo nitro em amina. No nosso entendimento esse é o primeiro relato da identificação de bactérias associadas as esponjas de água doce na Amazônia com potencial para bioredução, servindo de base para novas investigações de comunidades microbianas existentes em esponjas de água doce nas águas da região.

Palavras-chave: esponja – água doce – bactéria - biocatálise

Bacteria Microbiota Associated to Amazonian Fresh Water Sponges

ABSTRACT

Sponges are multicellular organisms classified in the phylum Porifera, been considered the most primitive metazoan. They present a cellular structure without true tissues. They live in tropical oceans, temperate and polar regions, and some species inhabit fresh water bodies. Sponges provide particular microenvironment conditions within their tissues. It allows them to the harboring of a diverse microbial community, which will be generating secondary metabolites. Those metabolites represent a source to search for new compounds of biotechnological interest. The ecological study of these microorganisms permits a better understanding of interaction dynamics and processes occurring in the environment. Different strategies could be applied to the analyze of genetic diversity of microorganisms in an environmental sample. Bacterias are key participants on natural ecosystems, mainly due their metabolic variability and adaptable physiology. Biocatalysis or biotransformation is the technique that uses biological catalysts to convert a substrate. It promotes chemical changes using enzymes (isolated or as parts of live microorganisms), The technology is competitive and doesn't harm the environment and is able to produce bioactive compounds with high enantiomeric purity. This work aims to characterize the microorganisms (bacteria) associated to freshwater sponges from two different Amazonian locations. The sponges were collected in the vicinities of the cities of Parintins and Manaus. Bacterias were grown and purified in selective medias. DNA extractions were made and sequencing of a 16S rDNA gene fragment performed for identification fingerprinting. The bioreduction reaction was performed with three bacterial strains and three substrates, p-nitroacetophenone, acetophenone and 3-hydroxy-2-methylene-3-(4'-nitrophenyl) methyl propanoic acid. The reaction progress was monitored by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography Mass-Spectrometer (CG-MS). Hundred isolates were obtained from samples collected from Parintins and 117 isolates from Manaus. From these isolates, 31.5% were identified as belonging to *Bacillus* genus. Regarding the bioreduction reactions, the three bacterias showed the same retention time (13 minutes), and the reduction was considered as chemoselective, because bacteria reduced the nitro group present in amine. To our knowledge this is the first report of communities of bacteria associated to Amazonian fresh water sponges performing selective bioreduction. This work provide initial basis to further investigations of microbial communities in freshwater sponges in the Amazon region.

Keywords: sponge – freshwater – bacteria - biocatalysis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	13
1.1 ESPONJAS (PORIFERA).....	13
1.2 BACTÉRIAS	15
1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	16
1.4 BIOCATÁLISE	18
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICO.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 COLETA DO MATERIAL.....	23
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO	25
3.3 ISOLAMENTO	25
3.4 PURIFICAÇÃO	26
3.5 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS EM MEIO LÍQUIDO	26
3.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	26
3.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA.....	26
3.8 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	26
3.9 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 27-1401 DO 16S rDNA	27
3.10 IDENTIFICAÇÃO UTILIZANDO O GENE 16S rDNA.....	28
3.11 REAÇÃO DE BIORREDUÇÃO.....	28
3.11.1 Condições de crescimento das culturas de bactérias	28
3.11.2 Reação em pequena escala.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	29
4.2 REAÇÃO DE BIORREDUÇÃO:.....	35
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

INTRODUÇÃO

Esponjas são considerados os mais primitivos seres multicelulares e pertencentes ao filo porífera, (LI et al., 1998). Esponjas apresentam uma estrutura celular sem tecidos verdadeiros e suas funções corporais são fundamentadas em diferentes tipos celulares especializados, que exercem uma ação semelhante aos órgãos nos metazoários superiores (SIMPSON, 1984). Vivem em oceanos tropicais, temperados e polares, também sendo encontradas espécies que habitam em água doce (TAYLOR et al., 2007).

As esponjas apresentam diversas formas corporais que englobam várias formas (por exemplo, incrustantes, corda, bola, tubo, cano vaso), cores (exemplo; branco, amarelo, verde, azul, roxo, marrom, preto) e tamanhos (alguns milímetros a quase dois metros), que podem ser bastante variáveis dependendo das condições ambientais (BRUSCA & BRUSCA, 1990).

As esponjas estão estreitamente associadas a uma comunidade microbiana complexa que inclui tanto microrganismos fototróficos (algas e cianobactérias) e heterotróficos (eubactérias, arqueobactérias, protistas e fungos). As bactérias heterotróficas são responsáveis por até 40% da biomassa das esponjas (WEBSTER et al., 2001).

Bactérias ocorrem como um grupo de microrganismos cosmopolita predominante em habitats diferenciados. Possuem uma grande variedade de vias metabólicas compreendendo organismos heterotróficos e organotróficos (degradadores de compostos orgânicos), quimiotróficos e litotróficos (usam compostos inorgânicos como fonte de energia) e ainda os fototróficos (que utilizam a luz como fonte de energia no metabolismo) (CANHOS et al., 1999).

O estudo da ecologia de microrganismos procura acrescentar e consolidar a ciência a respeito dos processos interativos que ocorrem no ambiente. Nos últimos anos modernas tecnologias, sobretudo de genética molecular, estão propiciando a criação de um quadro mais completo sobre as interações microbianas que ocorrem nos diferentes ambientes (PROCÓPIO, 2007).

O estudo ecológico de microrganismos procura acrescentar e firmar os conhecimentos dos processos de interação que ocorrem no ambiente. Diferentes estratégias podem ser aplicadas para a análise da diversidade genética

microbiana em uma amostra ambiental, com o auxílio de ferramentas moleculares, tais como a clonagem e o sequenciamento de fragmentos de rDNA 16S amplificados por PCR (AMANN et al., 1995).

Os microrganismos, em muitos casos, são associados a aspectos negativos, especialmente no âmbito da saúde. Entretanto, muitos produzem substâncias capazes de contribuir com a saúde humana e o meio ambiente, este lado positivo dos microrganismos, vem sendo explorado por indústrias farmacêuticas, principalmente na biotecnologia que faz uso de organismos (CARVALHO, 2008).

Microrganismos, através de suas atividades, controlam ou influenciam todos os aspectos do funcionamento da biosfera, tanto na saúde como na nutrição, doenças em animais e plantas, bem como qualidade do meio ambiente (CARVALHO, 2008).

Fungos e bactérias produzem uma extensa abundância de metabólitos secundários que podem ser empregados em diversas aplicações. Cowan (1999) define as substâncias antimicrobianas ou antibióticas como um grupo especial de agentes terapêuticos, produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. Essas substâncias em concentrações pequenas deveriam possuir atividade letal ou inibitória contra amplas espécies microbianas, precaver o desenvolvimento de microrganismos resistentes, dentre outras características.

A utilização da biodiversidade através da triagem de microrganismo tanto de plantas como de células animais por métodos tradicionais, veem sendo explorada na busca de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em trabalhos na escala industrial (CARVALHO et al., 2008; DEMIRJIAN et al., 1999). Os microrganismos são especialmente escolhidos devido ao curto período de crescimento, pela diversidade dos processos metabólicos e pelo o envolvimento de enzimas. Não há uma limitação no número de microrganismos que possa ser testado, mesmo sendo diferentes entre si.

A utilização de catalisadores naturais na transformação de compostos orgânicos sintéticos é realizada há mais de 100 anos (FABER, 2004). No entanto, o desenvolvimento de biocatalisadores como ferramenta de síntese expandiu-se apenas ao longo das últimas décadas, associado ao conhecimento do modo de ação destes catalisadores biológicos.

Considerando o avanço dos processos biotecnológicos e a grande procura por novos compostos biologicamente ativos produzidos por microrganismos, este trabalho tem como proposta a avaliação da diversidade bacteriana e análise das características metabólicas produzidas a partir dos microrganismos associados às esponjas de água doce dos rios da Amazônia.

1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1.1 ESPONJAS (PORIFERA)

As esponjas (filo Porífera) estão entre os animais metazoários mais antigos, com registros de fósseis datados de mais 580 milhões de anos atrás no período Pré-cambriano (HENTSCHEL, 2006) e acredita-se que possam ter se originado a mais de 1 bilhão de anos (LI et al., 1998).

Somente na segunda metade do século XIX as esponjas de água doce foram identificadas, depositadas principalmente em museus da Europa e coletadas em sua maioria na Amazônia por viajantes e naturalistas, poucas espécies foram catalogadas por taxonomistas da época. Cerca de 13 espécies no total. No entanto, trabalhos realizados por Volkmer-Ribeiro (1981) na segunda metade do século XX levou a estudos abrangentes de coleções principalmente da Amazônia e do Rio Grande do Sul (VOLKMER-RIBEIRO, 1999). Tendo como ponto de partida a revisão feita por Penney & Racek (1968) das esponjas dulciaquícolas produtoras de gêmulas, realizou-se o levantamento de vários gêneros, a criação de outros, descrições de novas espécies e a sugestão de uma nova família (VOLKMER-RIBEIRO, 1999).

Segundo Volkmer-Ribeiro (1999), até o ano de 1999, eram reconhecidos no mundo 26 gêneros de esponjas de água doce produtoras de gêmulas e sete gêneros não produtoras. Do total de cerca de 150 espécies então identificadas, cerca de 130 espécies são produtoras de gêmulas enquanto que cerca de 20 são não produtoras.

Destas, oito gêneros de esponjas gemulíferas e um de esponjas não-gemulíferas são endêmicos da região Neotropical. O Brasil conta com o registro de 20 gêneros e 44 espécies de esponjas.

Em estudos mais recentes realizados por Pinheiro (2007) observou-se que de um universo de 8000 espécies de esponjas já descritas, apenas 188 são dulciaquícolas (MANCONI & PRONZATO, 2002) e que o Brasil possui 52 espécies, sendo que a maioria destes registros se encontra no Estado do Rio Grande do Sul e na Região Amazônica.

Esponjas são conhecidas por colonizar substratos próximos à superfície das águas (lagoas e lagoinhas) interinas e expostas ao sol (VOLKMER-RIBEIRO, 1999), e são indicadoras ambientais de qualidade como foi observado na região Neotropical, com comunidades e espécies típicas de grandes ambientes (VOLKMER-RIBEIRO, 1999).

Na região Amazônica, que abrange a Amazônia Venezuelana, foi relatada uma comunidade que ocupa os lagos de várzea caracterizados como ambientes de inundação temporária, enquanto outras ocupam ambientes permanentemente submersos como os substratos rochosos profundos de rios dessa região (VOLKMER-RIBEIRO e TAVARES, 1997).

Atualmente as esponjas são distribuídas em três classes (HOOPER E VAN SOEST, 2002):

Classe Calcarea: esponjas com esqueleto unicamente formado por espículas de carbonato de cálcio, não se notam fibras de espongina. Encontradas em águas rasas em sua maioria.

Classe Hexactinellida: conhecidas como “esponjas de vidro”. Têm espículas compostas por sílica e seus “tecidos”, diferentemente das outras classes, são arranjados de forma sincicial. São encontradas em grandes profundidades.

Classe Demospongiae: composta por maior grupo de esponjas, mais de 95% das espécies totais do filo. O esqueleto pode ser composto por sílica e/ou espongina. São encontradas em todos os ambientes aquáticos.

As esponjas dulciaquícolas pertencem à classe Demospongiae, e sua taxonomia assim como as esponjas marinhas é baseada especialmente no estudo da morfologia dos seus elementos espiculares. Suas espículas podem ser classificadas em megascleras, microscleras e gemoscleras (PINHEIRO, 2007).

As esponjas permitem a formação de um microambiente dentro de seus tecidos, abrigando uma ampla diversidade microbiana produtora de metabólitos

secundários ainda não caracterizados, representando um potencial não explorado na busca por novos compostos de interesse biotecnológico (TURQUE, 2007).

1.2 BACTÉRIAS

As bactérias são um grande grupo de microrganismos denominados como procariontes (5236 espécies, COHAN, 2001), tipicamente com vários micrometros de comprimentos e se apresentam em formas variadas (cocos, bacilos, espirilos, entre outros). Sua parede celular pode apresentar função protetora do seu DNA cromossômico, moléculas circulares denominadas plasmídeos e demais estruturas morfológicas (MALAJOVICH, 2009).

A reprodução das bactérias é, primariamente, por divisão binária gerando duas células filhas iguais que em condições favoráveis de umidade, temperatura, acidez e de disponibilidade de nutrientes, elas podem atingir altas taxas de crescimento produzindo milhões de novas células em poucas horas (HAWKER et al., 1960; STEVENSON et al., 1974; MALAJOVICH, 2009). No entanto, algumas espécies de bactérias apresentam reprodução sexuada, possibilitando a recombinação do material genético. Outra forma de ocorrência de variação no material genético é através da mutação gênica (HAWKER et al, 1960).

Os microrganismos são utilizados para produzir diversas substâncias industriais, servindo também como fontes de alimento (STEELE & STROWERS, 1991). Desempenham um importante papel nos processos vitais dos ciclos geoquímicos, também são fundamentais no equilíbrio de populações, na remediação ambiental, na manutenção de ecossistemas etc. As bactérias, por exemplo, são consideradas como parte chave na maioria dos ecossistemas naturais, especialmente devido à sua versatilidade metabólica e à sua adaptabilidade fisiológica.

Algumas das substâncias isoladas de esponjas têm semelhanças estruturais com metabólitos de origem microbiana (PROKSCH et al., 2002). Evidências sugerem que os microrganismos poderiam muito bem ser a verdadeira fonte de pelo menos alguns desses metabólitos (BEWLEY, 1996; IMHOFF, 2003). Isso oferece a possibilidade de usar as bactérias associadas às esponjas na produção de substâncias biologicamente ativas em vez das próprias esponjas. Como as bactérias produzem rapidamente grandes quantidades de biomassa,

seus produtos secundários biológicos podem ser facilmente produzidas em escala biotecnológica, ou seja, em grandes quantidades sem a necessidade da colheita ou cultivo de esponjas (THIEL, 2003).

Esponjas e seus microrganismos associados são responsáveis por mais de 5.300 de produtos diferentes, e todos os anos centenas de novas substâncias são descobertas (FAULKNER, 2002, 2000).

A ocorrência de substâncias químicas não conhecidas em esponjas e que não são produzidas exclusivamente a partir de microrganismos, levou a hipótese de que tais substâncias são de origem microbiana (PIEL, 2004).

Por sua vez, a síntese química de produtos naturais pode ser problemática e cara, devido à complexidade estrutural que apresenta (AICHER et al., 1992; SIPKEMA et al., 2005). A constatação que ao menos algumas substâncias podem ser produzidas por microrganismos aumentou as esperanças de obter uma sustentabilidade. Essencialmente ilimitadas substâncias para teste e posterior produção de drogas através do cultivo de bactéria (PROKSCH et al., 2002; PIEL, 2004).

1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

O estudo ecológico de microrganismos procura acrescentar e firmar os conhecimentos dos processos de interação que ocorrem no ambiente. Diferentes estratégias podem ser aplicadas para a análise da diversidade genética microbiana em uma amostra ambiental, com o auxílio de ferramentas moleculares, tais como a clonagem e o sequenciamento de fragmentos de rDNA 16S amplificados por PCR (AMANN et al., 1995).

O emprego das técnicas fundamentadas nos ácidos nucleicos tem ajudado nos estudos de diversidade microbiana, pois estes não dependem da condição fisiológica do microrganismo, assim possibilitando também o estudo de metagenômica (PROCÓPIO, 2007).

As características de um microrganismo podem ser previstas de acordo com a avaliação do tipo filogenético. Certas características dos organismos podem ser presumidas esperando que todos os que representam um certo grupo filogenético apresentem propriedades que ocorram freqüentemente no grupo. A seqüência da molécula de DNA (informação genotípica) compõe o

histórico do desenvolvimento do organismo onde se originaram as sequências. Para a construção de árvores filogenéticas e para obtenção de representações esquemáticas quantitativas da diversidade evolutiva pode-se utilizar as diferenças nas sequências geradas (LUDWIG; SHLEIFER, 1994).

As questões sobre a diversidade microbiana são difíceis de serem respondidas por métodos tradicionais, por isso a utilização dos métodos moleculares oferece mais respostas a essas questões. No entanto, embora essas ferramentas moleculares colaborem para o estudo dos microrganismos, as técnicas tradicionais são fundamentais para a caracterização da fenotipagem e do seu comportamento no ambiente (PROCÓPIO, 2004).

O genes 16S rDNA ribossomais estão sendo escolhidos de maneira preferencial por permanecerem presentes em todos os microrganismos procariontes, por derivarem de um ancestral comum e também por serem geneticamente constantes apresentando assim, uma dimensão suficiente para análises filogenéticas. Além disso, entre todos os organismos que compartilham a mesma espécie de rRNA, as seqüências de rDNA são extremamente conservadas, e por isso possuem algumas regiões variáveis, podendo o grau de variação nessas regiões específicas ser modificado de um táxon a outro (PROCÓPIO, 2004).

Para os estudos das relações filogenéticas entre bactérias e identificação das mesmas, têm-se utilizado as sequências do gene 16s rRNA, onde podem ser visualizadas em árvores filogenéticas, estas são formadas através de sequências de moléculas de RNA ribossomais. Podendo as árvores, entre outras coisas, definir a distância evolutiva entre as sequências dos organismos e inferir a posição de ancestralidade (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994). Diferentes tipos de árvores filogenéticas podem ser construídas através do uso de vários métodos (STACKEBRANDT; GOODFELLOW, 1991; VAN DE PEER; CHAPELLE; DE WACHTER, 1996). Utilizando o gene 16s rRNA é possível por meio de regiões variáveis o desenho de sondas para o estudo de gêneros ou espécie. (GELSOMINO et al., 2004; KIM et al., 2004).

Ainda que haja um amplo número de técnicas, revelando o polimorfismo de DNA, é notável que se considere o tipo de organismo e o objetivo do estudo.

Para estudos filogenéticos em bactérias, os genes que codificam as subunidades ribossomais são comumente os mais utilizados. Por conter regiões

variáveis e ao mesmo tempo regiões altamente conservadas as sequências de 16S rRNA especificamente são as mais utilizadas, admitindo uma análise das relações filogenéticas das espécies bacterianas de interesse (PROCÓPIO, 2007).

1.4 BIOCATÁLISE

Biocatálise ou biotransformação é a técnica que usa catalisadores biológicos como, enzima ou microrganismo para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. Para que a biotransformação tenha eficácia, necessita-se da análise de um conjunto de fatores (LEHMKUHL, 2006).

A escolha de um biocatalisador que possua condições experimentais para a bioconversão e isolamento, purificação e caracterização do produto que será formado é o que determina a técnica da biocatálise. No entanto, é preciso ainda analisar condições de pH, temperatura e a solubilidade do substrato em meio aquoso (meio natural dos biocatalisadores). Havendo necessidade, pode-se acrescentar um solvente orgânico que seja compatível com biocatalisador como uma segunda fase (LEHMKUHL, 2006).

A biocatálise faz o aproveitamento do potencial catalítico de microrganismos e enzimas tanto para a elaboração de produtos alimentícios, energéticos e farmacêuticos (VIEIRA, 2006; STINSON, 1994).

O surgimento da biocatálise ocorreu no início da civilização quando povos primitivos usavam processos fermentativos para transformação de matérias, como produção de bebidas alcoólicas, de pães e de derivados do leite (VIEIRA, 2006).

Recentemente os estudos científicos das biotransformações estão sendo utilizados como base para sínteses químicas, para ampliações, degradações ou resoluções racêmicas de compostos naturais ou sintéticos (STINSON, 1994).

A biocatálise promove transformações químicas utilizando enzimas, isoladas ou pertencentes a microrganismos vivos, surgindo assim como uma tecnologia competitiva e que não agride o meio ambiente para fabricação de substâncias bioativas com elevado grau de pureza enantiomérica (VIEIRA, 2006).

A enzima é uma biomolécula, tanto como proteína ou como RNA, que catalisa uma reação química específica. Ela não afeta o equilíbrio da reação catalisada; ela intensifica a velocidade da reação por proporcionar uma via de reação com energia de ativação mais baixa (LEHNINGER, 2011).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB) as enzimas são agrupadas em 6 classes (Figura 1)

Classe da Enzima	Tipo de reação catalizada	
Oxidorrredutases	Transferência de elétron (íons hidretos ou átomos de Hidrogênio, ou seja, reação de oxidação-redução. Ex. Desidrogenases e Oxidases	
Transferases	Transferência de grupos funcionais (-NH ₂ , -COOH, etc.). Ex. Quinases Transferases	
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água). Ex. Peptidases.	
Liasas	Adição de grupos a ligação dupla, ou formação de ligação dupla por remoção de grupos. Ex. Dehidratases e as Descarboxilases.	
Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula para produzir formas isoméricas. Epimerases	
Ligases	Formação de C-C, C-S, C-O, e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares. Ex. Sintetases.	

Figura 1: Classes de enzimas. Adaptado de LEHNINGER (2011) e do sítio: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/enzimas/enzimas-8.php>. Acesso: 25/01/2012 as 17:00

O emprego de enzimas em síntese orgânica tem se mostrado como uma alternativa viável, chamada “química verde” (*green chemistry*) e ecologicamente correta, sobretudo pelos menores impactos no meio ambiente. A variabilidade de

reações que são catalisadas por enzimas e microrganismos é de especial interesse por apresentarem várias vantagens. A ampla variedade de processos metabólicos, condições brandas de reações, natureza régio, quimio e enantiosseletiva, o número ilimitado de microrganismos na natureza são algumas vantagens notórias em sínteses orgânicas (VIEIRA, 2006). Quanto aos aspectos de seletividade das reações enzimáticas (FABER, 2004), essas podem ser:

Quimioseletividade - o propósito de a enzima agir sobre um único tipo de grupo funcional, outras funcionalidades sensitivas, que normalmente reage em certo ponto sob a catálise química, para resistir inalterada. Como resultado reações geralmente tendem a serem “limpas”, facilitando assim o processo de purificação.

Regioseletividade e Diastereoseletividade - devido a sua complexa estrutura tridimensional, enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situadas em regiões diferentes da molécula do substrato.

Enantioseletividade - último mais não menos importante, todas as enzimas são feitas a partir de L-aminoácido sendo assim catalisadores quirais. Como consequência qualquer tipo de quiralidade presente no substrato da molécula é “reconhecida” sobre a formação do complexo enzima-substrato. Assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo através de um processo de desmetilação e ambos enantiômeros do substrato rancêmico freqüentemente reage a diferentes velocidades, oferecendo uma resolução cinética.

Estas últimas propriedades constituem a ‘especificidade’ de uma enzima e representa a mais importante característica para seletiva e assimétrica exploração.

Os microrganismos proporcionam uma boa possibilidade de manipulação, pois possuem crescimento em diversos ambientes e condições, um ciclo de vida curto, produzindo assim quase sempre um conjunto abundante de enzimas que são ativas e podem ser isoladas e inseridas em meios adequados (CIHANGIR e SARIKAYA, 2004; SEXTON et al., 2009).

O estudo das associações ecológicas entre seres vivos, especialmente os que compreendem os microrganismos, pode ser uma boa opção para busca de enzimas úteis nos processos sintéticos. Ainda que a maioria dos microrganismos seja cosmopolita, alguns se associam especificamente a certo substrato,

admitindo como hospedeiros de preferência e associando-se de forma mutualista (PETRINI, 1992; MÜLLER e KRAUSS, 2005). Nesses casos, a associação com o hospedeiro pode vir acompanhado de uma ligação muito grande no nível bioquímico (PETRINI, 1992). Criando-se uma associação, os microrganismos podem iniciar a produção de enzimas com atividades semelhantes ou idênticas que são produzidas pelo hospedeiro (MÜLLER e KRAUSS, 2005).

As reações de biotransformação são realizadas empregando-se enzimas isoladas ou células integras de organismos vivos (plantas, pequenos animais, etc) ou microrganismos (leveduras, bactérias e fungos). Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies, mas apesar das inúmeras aplicações biológicas apresentadas na literatura (GALM e SHEN, 2007; NEWMAN et al., 2003) os fungos e as bactérias constituem ainda dois grupos poucos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário, se for considerado proporcionalmente o número de espécies descritas (STROBEL e DAISY, 2003).

Os microrganismos de fato são seres muito importantes por inúmeros motivos, pois participam no desenvolvimento das plantas através da disponibilidade de nutrientes (micorrizas), na fermentação para produção de alimentos, na produção de substâncias valiosas, como ácido cítrico, ciclosporina, penicilina dentre outras substâncias biologicamente ativas.

As principais características que tornam os microrganismos úteis para produção de tais compostos, os quais poderiam ser obtidos de plantas ou por sínteses químicas, são a alta razão superfície/volume, que promove o consumo rápido de nutrientes para seu metabolismo e biossíntese; a extensa variedade de reações que os microrganismos têm a capacidade de realizar; a enorme facilidade de adequação em diferentes ambientes, permitindo assim o seu deslocamento da natureza para meios artificiais, no qual eles utilizam fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo para crescer e produzir compostos de interesse; e a vasta diversidade de espécies, que podem produzir diferentes enzimas, que são capazes de catalisar as mesmas reações, permitindo assim, um monitoramento diferenciado nas condições de cultivo (ADRIO e DEMIAN, 2005).

O desenvolvimento de enzimas para uso industrial depende essencialmente do uso de fontes microbianas. As enzimas de fontes microbianas são optadas sobre as de plantas e animais devido a sua viabilidade econômica para produção, consistência, simplicidade no processo de modificação e

otimização. Em geral, elas são enzimas relativamente mais estáveis do que as derivadas de plantas ou animais. Além de proporcionar uma ampla atividade catalítica (SABU et al., 2005)

Atualmente, visando o aperfeiçoamento de estratégias de produção na área da química fina, os métodos utilizados para a inserção de etapas biocatalíticas encontram-se cada vez mais focados. Procura-se a atividade específica de uma determinada enzima com a finalidade de se ter o composto de interesse em alto rendimento, de fácil purificação e, principalmente de custo baixo. Essa otimização é inteiramente justificada e responde bem as exigências atuais de desenvolvimento sustentável (FABER, 2004).

Hoje em dia, anseia-se cada vez mais o emprego de enzimas puras nas reações de biotransformação. Mas para que se torne mais alcançável, os estudos procuram não só a avanço da eficiência das reações, como também a redução dos gastos para realizá-las. Dessa forma, muitos microrganismos são explorados e usados para as biotransformações. As enzimas associadas aos microrganismos não necessitam do acréscimo de cofatores, já que os mesmo são encontrados presentes naturalmente no sistema enzimático total dos mesmos.

Os microrganismos são particularmente interessantes na busca de novos biocatalisadores e descobertas de novas enzimas, devido ao amplo potencial de produção de metabólitos secundários, com grandes aplicações nas mais diferenciadas áreas (químicas, biológicas, farmacêuticas, etc.).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar a composição taxonômica de diferentes grupos ecológicos de bactérias associadas a esponjas de água doce, passíveis de isolamento e verificar capacidade biorredução seletiva de substratos.

2.2 ESPECÍFICO

1. Isolar e purificar os grupos que compõe a microbiota bacteriana associada à esponja;
2. Sequenciar o gene 16s rDNA dos isolados bacteriana associada à esponja;
3. Identificar os grupos que compõe a microbiota bacteriana associada à esponja;
4. Estabelecer coleção inicial de bactérias associadas a esponjas (*Drullia browni* - Bowerbank, 1863 e *Metania reticulata* - Bowerbank, 1863);
5. Verificar a capacidade isolados bacterianos na bioedução dos substratos, *p*-nitroacetofenona, acetofenona e 3-hidroxi-2-metileno-3-(4'-nitrofenil)propanoato de metila.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL

As coletas das esponjas foram realizadas no período da estiagem, no município de Parintins que fica localizado a margem direita do Rio Amazonas e no município de Manaus (Figura 1) que se situa a margem esquerda do Rio Negro. Esponjas que se encontravam foram da água sobre ramas de arvores foram removidas e acondicionadas em bolsas de papel e essas em bolsas plásticas para serem levadas ao laboratório. Todas as coletas foram realizadas no mesmo dia e as amostras foram processadas em até 24 horas em laboratório.

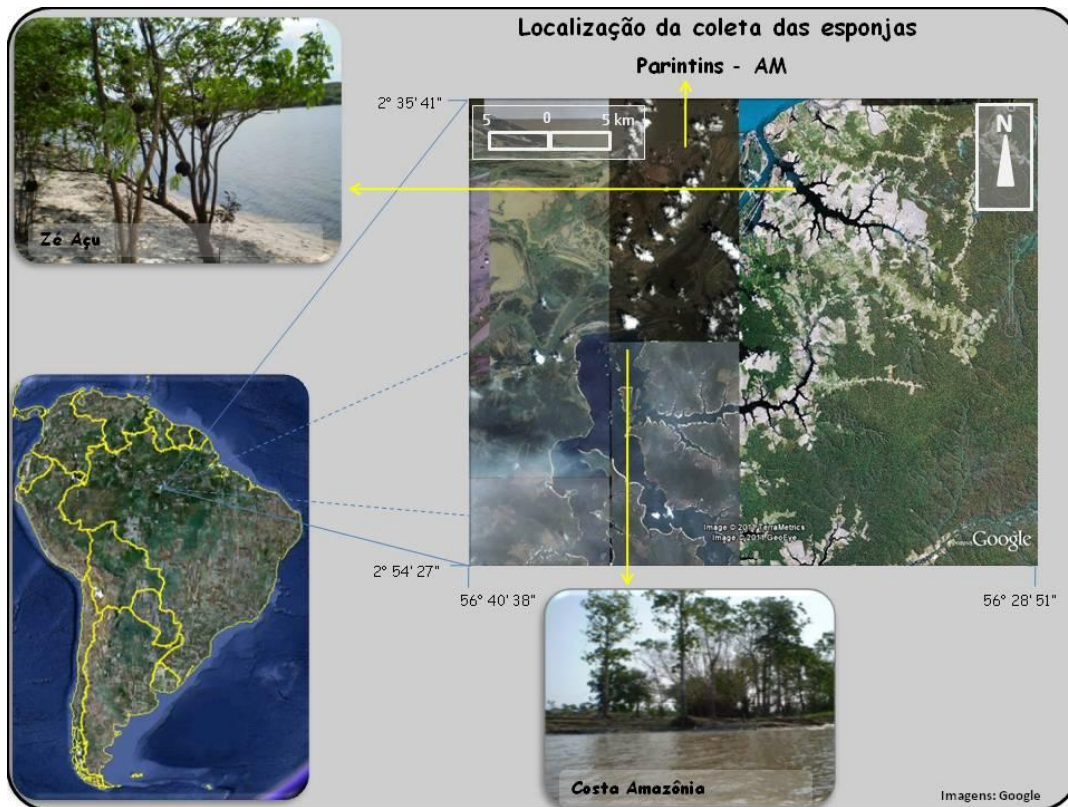


Figura 2: Localização das coletas no município de Parintins. As setas indicam o local no mapa e as fotos ilustram o local onde a coleta das esponjas foi realizada



Figura 3: Localização das coletas no município de Manaus na comunidade Sem Terra e rio Tarumã

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO

Em laboratório, as amostras de esponjas coletadas foram cortadas com uma lâmina de bisturi estéril e separadas em sub-amostras e acondicionadas em tubos com tampa de rosca com volume de 8 mL previamente autoclavados e identificados, uma parte não realizou-se assepsia e a outra foi submetida a uma assepsia superficial.

No tratamento com assepsia, foi utilizado por primeiro álcool 70% durante 1 minuto descartando em seguida, após o hipoclorito 2,5% por 1 minuto descartando, e novamente em álcool 70%, em seguida foi utilizada água estéril por três vezes e descartada, posteriormente foi inserida 3 mL de solução Fosfato 1%, anteriormente preparada e autoclavada por 30 minutos em todos tubos para devida diluição, e em seguida com o auxílio de um gral e pistilo previamente esterilizados em autoclave, retirou-se as amostras para a maceração, após a obtenção do macerado colocou-se as amostras em novos tubos autoclavados e identificados.

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação das amostras.

3.3 ISOLAMENTO

Foram preparados meios de cultivo sintéticos (HIMEDIA) do tipo TSA (Trypticase Soy Agar), TSB (Tryptose Soy Broth), AC (Amido Caseína) e NA (Nutriente Agar). Após preparação, os meios foram autoclavados e vertidos em placas de Petri previamente esterilizadas, utilizando câmara de fluxo laminar para evitar contaminação.

Com o auxílio de uma pipeta automática foi retirada uma alíquota de 100 µL da amostra diluída, em seguida foi distribuída em placa de Petri contendo os meios acima citado e espalhada com uma alça de Drigalski e vedada com filme de PVC e identificada, após a este procedimento as placas de Petri foram colocadas em uma estufa incubadora B.O.D (Marconi-Incubadora MA415) à 26°C por 24 horas.

3.4 PURIFICAÇÃO

Após isolamento, as bactérias crescidas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias cruzadas, com auxílio de uma alça de platina que antes era embebida no álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen. Foram utilizados meios de cultivo apropriado para cada tipo de isolamento. Após, as placas foram colocadas na B.O.D por 24 horas para o crescimento bacteriano.

3.5 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS EM MEIO LÍQUIDO

Foi preparado o meio de cultivo NA (Caldo Nutriente). Para realização do método foram utilizados tubos de ensaio de 25 mL, onde 10 mL do meio líquido foram inseridos e em seguida autoclavado por 20 minutos. Posteriormente as bactérias crescidas após as 24 horas da purificação foram transferidas para tubos contendo o meio líquido e identificadas, depois foram colocadas em um agitador (Marconi-Incubadora shaker MA420) sob temperatura de 28°C e 150 rpm durante 48 horas.

3.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados crescidos no meio líquido NA (Caldo Nutriente) foram preservados com adição de 15% de glicerol (v/v) em microtubos de 2mL e estocados em freezer -20°C para os testes posteriores.

3.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA

Com o auxílio de uma pipeta automática foram retirados 10 µL dos isolados preservados em glicerol 15% e inseridos em placa de Petri contendo meio de cultura Nutriente Agar (NA), em seguida as placas foram colocadas em uma estufa incubadora B.O.D (Marconi-Incubadora MA415) à 26°C por 24 horas, para verificar o crescimento da colônia. As colônias crescidas foram caracterizadas de acordo com a cor, consistência e forma.

3.8 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Os isolados bacterianos foram cultivados em 10mL de meio de cultivo NA e incubados por 48 horas a 28°C. Após esse período, a suspensão bacteriana foi recolhida em tubos de 2 mL e centrifugada por 5 minutos a 9700g, *utilizando*

centrífuga Eppendorf Mini plus. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 500 μ L de TE (Tris-HCl 1M pH 7,5, 10mL; EDTA 0,5M pH 8,0, 2mL; água destilada, 1000mL) seguido de centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 500 μ L de TE sendo então adicionado 30 μ L de SDS 10% e 0,5g de sílica, e agitado em “bead beating” (Biospec products) por 30 segundos. Após a agitação, foram adicionados 500 μ L de fenol saturado, logo em seguida homogeneizadas e centrifugadas (9700g por 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo, acrescentando-se 6 μ L de RNase (Tris-HCl 10mM pH 8,0; NaCl 15mM; RNase 10mg/mL) e incubada por 30 min a 37°C. Posteriormente, a esta suspensão foram adicionados 200 μ L de fenol e 200 μ L de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e posteriormente centrifugada a 9700g por 5 min. O sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se 10% do volume de NaCl 5M e 60% volume de isopropanol. Incubou-se por 5 min em temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se por 10 min a 9700g. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 400 μ L de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 9700g. O sobrenadante foi removido, o DNA seco a 37°C e ressuscitado em 50 μ L de água Milli-Q e estocado a -20°C.

3.9 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 27-1401 DO 16S rDNA

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L (10 ng) de DNA molde; 0,2 μ M do primer 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e do primer R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'); 200 μ M de cada dNTP (Gibco BRL); 3,75 mM de MgCl₂; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). Em todos os experimentos foi adicionada uma reação sem DNA como controle negativo. Foi utilizado termociclador (Applied Biosystem) programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1min; 72°C; 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min, 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min; 57 °C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Serão utilizados 5 μ L da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 1350 pb.

3.10 IDENTIFICAÇÃO UTILIZANDO O GENE 16S rDNA

As identificações bacterianas foram realizadas na comparação das sequências obtidas com o seqüenciando do fragmento 27-1378 do gene 16S rDNA dos isolados. Para isso, após amplificação os produtos de PCR foram purificados com o DNA Gel/PCR Extraction Kit. As amostras foram sequenciadas na Universidad de Puerto Rico utilizando sequenciador ABI (Applied Biosystems). Após o recebimento das seqüências, as mesmas foram editadas e analisadas por meio de BLASTn contra a base de dados (GenBank), onde foi observada a similaridade destas seqüências com sequência de 16S rDNA de espécies já depositadas nesta base de dados.

3.11 REAÇÃO DE BIORREDUÇÃO

As reações de biorredução foram realizadas no laboratório de Biorgânica/MBT e no NAI – Núcleo de Apoio Instrumental de análise química e estrumental.

3.11.1 Condições de crescimento das culturas de bactérias

Para obtenção das bactérias isoladas foi retirado 100µL das AMOSTRAS conservadas em glicerol 15% depositadas na coleção CEAB/INCT e plaqueadas em meio de cultura, incubadas durante 24h em estufa B.O.D. a 28°C para o devido crescimento. Após, as colônias isoladas foram retiradas e cultivadas em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100ml de meio de cultura NA a 30 ° C (48 h) em um agitador orbital (170 rpm). Após esta etapa, as células foram extraídas por centrifugação (5000 rpm, 20 min, 10 °C) e utilizadas para bio-redução de cetonas.

3.11.2 Reação em pequena escala

As células produzidas a partir de 100mL de meio de cultura foram ressuspensas em 30mL de uma solução tampão fosfato (pH 7,0, 0,1 M) em um erlenmeyer (125 mL), seguido pela adição da para-nitroacetofenona (0,0059 g/ 1mL de DMSO), acetofenona (4,16 µL/ 1mL de DMSO) e 3-hidroxi-2-metileno-3-(4'-nitrofenil) propanoato de metila (4,2 µL/ 1mL de DMSO).

A mistura reacional foi agitada em agitador orbital (30° C, 170 rpm) e monitorada por 6 dias, através das aliquotas (1mL) retiradas das amostras a cada 24h. Estas amostras foram extraídas por meio de agitação com acetato de etila (0,5 mL), seguida por centrifugação (6000 rpm, 5 min.).

A bioedução foi monitorada por análise de Cromatografia Gasosa (marca SHIMADZU, equipado com auto injetor modelo GC-2010 e detector de Ionização de chama – FID e Coluna quiral para CG SUPELCO - Sigma Aldrich / CP-BETA DEX-110: sílica 30m x 0.25 µL x 0.25mm x 0.25µm.) e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de Massa (SHIMADZU 2010 e espectrômetro de massas SHIMADZU QP 2010) utilizando coluna capilar RTX da Restec de 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com fase estacionária de 0,25 µm) na Central Analítica – MBT.

Parâmetros			
CG		CG-MASSA	
Coluna	Beta Dex	Coluna	RTX da Restec
Temperatura do injetor	200°C	Temperatura do injetor	200°C
Temperatura do detector	220°C	Temperatura do detector	220°C
Temperatura inicial e final	165°C	Temperatura inicial e final	165°C
Tempo inicial	0 min	Tempo inicial	0 min
Tempo total de análise	22 min	Tempo total de análise	42 min

Figura 4: Parâmetros de configuração da programação dos equipamentos de análises

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO

As esponjas têm provavelmente hospedado microrganismos associados desde a primeira aparição do filo mais de 500 milhões de anos atrás (WILKINSON, 1984).

Hoje em dia as esponjas podem hospedar uma variedade de microrganismos, incluindo cianobactérias (VINCENTE 1990; ARILLO et al., 1993; MAGNINO et al., 1999), diversas bactérias heterotróficas (WILKINSON 1978; SANTAVY et al 1990; MAGNINO et al., 1999), as algas unicelulares (SARA e

LIACI 1964; RÜTZLER 1990; WILKINSON, 1992), fungos (HOLLER et al., 2000; WEBB e MAAS, 2002), e zoochlorellae (GILBERT e ALLEN, 1973).

As bactérias que vivem em simbiose com esponjas, podem ser passadas através das suas câmaras de alimentação sem ser digeridas. Isto sugere algum tipo de encapsulação ou de reconhecimento do processo (WILKINSON, 1987).

Devido as interações de esponja-bactérias serem de ampla ocorrência e, em alguns casos, específico para o hospedeiro, acredita-se geralmente que existam interações simbióticas entre as esponjas e microrganismos. (WEISZ et al., 2007, HENTSCHEL et al., 2002; HAYGOOD et al., 1999). Funções simbióticas que têm sido atribuídos a simbiontes microbianos incluem, a aquisição de nutrientes (HENTSCHEL et al., 2002), a estabilização do esqueleto esponja (HENTSCHEL et al., 2002; RÜTZLER, 1985), o processamento de resíduos metabólicos (BEER e ILAN, 1998), e produção de metabolitos secundários (BEWLEY et al., 1996; SCHMIDT et al., 2000; UNSON et al., 1994). Este último aspecto é de particular interesse farmacêutico e biotecnológico, como produtos naturais derivados de esponja muitos podem ser de fato de origem microbiana.

Os estudos de esponjas associadas a bactérias são relativamente abundantes, entretanto em sua maioria são referentes às esponjas marinhas e pouco estão relacionados às esponjas de água doce, não se conhece nenhum estudo de diversidade simbiótica de esponjas de água doce com bactérias na região Amazônica.

No presente estudo foram isoladas 217 bactérias (Tabela 1) de esponjas coletadas dos municípios de Parintins e Manaus. Deste total, foram identificadas apenas 30 cepas de bactérias do município de Parintins (Tabela 2). Embora tenha sido possível identificar apenas 30 cepas, este número se torna expressivo em se tratando da região Amazônica que não possui estudos relacionados à associação de bactérias com esponjas de água doce. Trabalhos similares identificaram bactérias em outros biomas, como em lago (PARFENOVA et al., 2008) e marinhos (LEE et al., 2009; MUSCHOLL-SILBERHORN et al., 2008; LI, 2009; RADJASA, 2007; ANAND et al., 2006; TURQUE et al., 2007) entre outros.

Tabela 1: Número de isolados bacterianos provenientes dos diferentes locais e espécies de esponjas *Drullia browni* e *Metania reticulata*

Locais			Total Bactérias
Parintins		Manaus	
Zé Açú	Costa Amazônica	Comunidade Sem Terra	
74	26	117	217

Dentre as colônias isoladas não foram verificadas diferenças significativas nos gêneros em relação ao método de assepsia e não assepsia, algumas apresentam características morfológicas diferenciadas (cor, textura e forma), no entanto houve semelhanças entre os gêneros, como pode ser observado na Tabela 2 e na Figura 5.

Em um estudo realizado por Batista (2009) com bactérias epifíticas e endofíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes* na Amazônia, observou características morfológicas semelhantes aos isolados encontrados no presente trabalho. Batista (2009), também identificou bactérias do gênero *Bacillus* (10,4%) e *Pseudomonas* (8,3%) corroborando com gêneros isolados das esponjas na mesma região, embora a microbiota bacteriana tenha sido isolada de organismos diferentes, no entanto o ecossistema aquático é idêntico para ambos os estudos por serem realizados na região Amazônica.

Os gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* isolados das esponjas de água doce da região Amazônica, também podem ser encontrados em outras espécies de esponjas em ambiente marinho, como foi observado por Menezes (2010) em um trabalho realizado na costa norte do estado de São Paulo, onde ele verificou que nas quatro espécies de esponjas marinhas estudadas a maior predominância dos isolados bacterianos foi do gênero *Bacillus* com 18,25%, no entanto o gênero *Lysinibacillus* apresentou uma frequência apenas de 5%, enquanto que no presente trabalho a frequência foi de 13,6%.

Tabela 2: Características morfológicas e gêneros identificados de vinte e nove culturas de bactérias isoladas de esponjas de água doce de dois locais, Zé Açú e Costa Amazônia no município de Parintins/AM

Código da coleção	Característica Morfológica			Espécie cuja sequencia apresentou maior similaridade através de BLASTn
	Cor	Textura	Forma	
Com Assepsia				
UEA 20301	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Paenibacillus</i> sp.
UEA 20302	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20337	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20340	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20344	Branca	Rugosa	Circular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20345	Amarela	Lisa	Circular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20347	Amarela	Cremosa	Circular	<i>Lysinibacillus</i> sp.
UEA 20350	Branca	Aveludada	Circular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20351	Amarela	Lisa	Circular	<i>Delftia</i> sp.
UEA 20354	Branca	Rugosa	Circular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20373	Branca	Rugosa	Irregular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20379	Creme	Aveludada	Irregular	<i>Lysinibacillus</i> sp.
UEA 20380	Branca	Rugosa	Irregular	<i>Pseudomonas</i> sp.
UEA 20390	Amarela	Rugosa	Circular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20398	Branca	Aveludada	Circular	<i>Lactococcus</i> sp.
Sem Assepsia				
UEA 20304	Amarela	Cremosa	Circular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20305	Amarela	Cremosa	Circular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20307	Branca	Rugosa	Circular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20330	Branca	Aveludada	Circular	<i>Bacillus cereus</i>
UEA 20332	Branca	Aveludada	Circular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20333	Branca	Aveludada	Circular	<i>Delftia</i> sp.
UEA 20334	Amarela	Aveludada	Irregular	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
UEA 20341	Branca	Rugosa	Irregular	<i>Lysinibacillus</i> sp.
UEA 20343	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Delftia</i> sp.
UEA 20363	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Bacillus</i> sp.
UEA 20371	Branca	Aveludada	Irregular	<i>Enterobacter</i> sp.
UEA 20372	Branca	Lisa	Irregular	<i>Pseudomonas</i> sp.
UEA 20384	Amarela	Rugosa	Circular	<i>Pseudomonas</i> sp.
UEA 20400	Creme	Lisa	Circular	<i>Bacillus</i> sp.

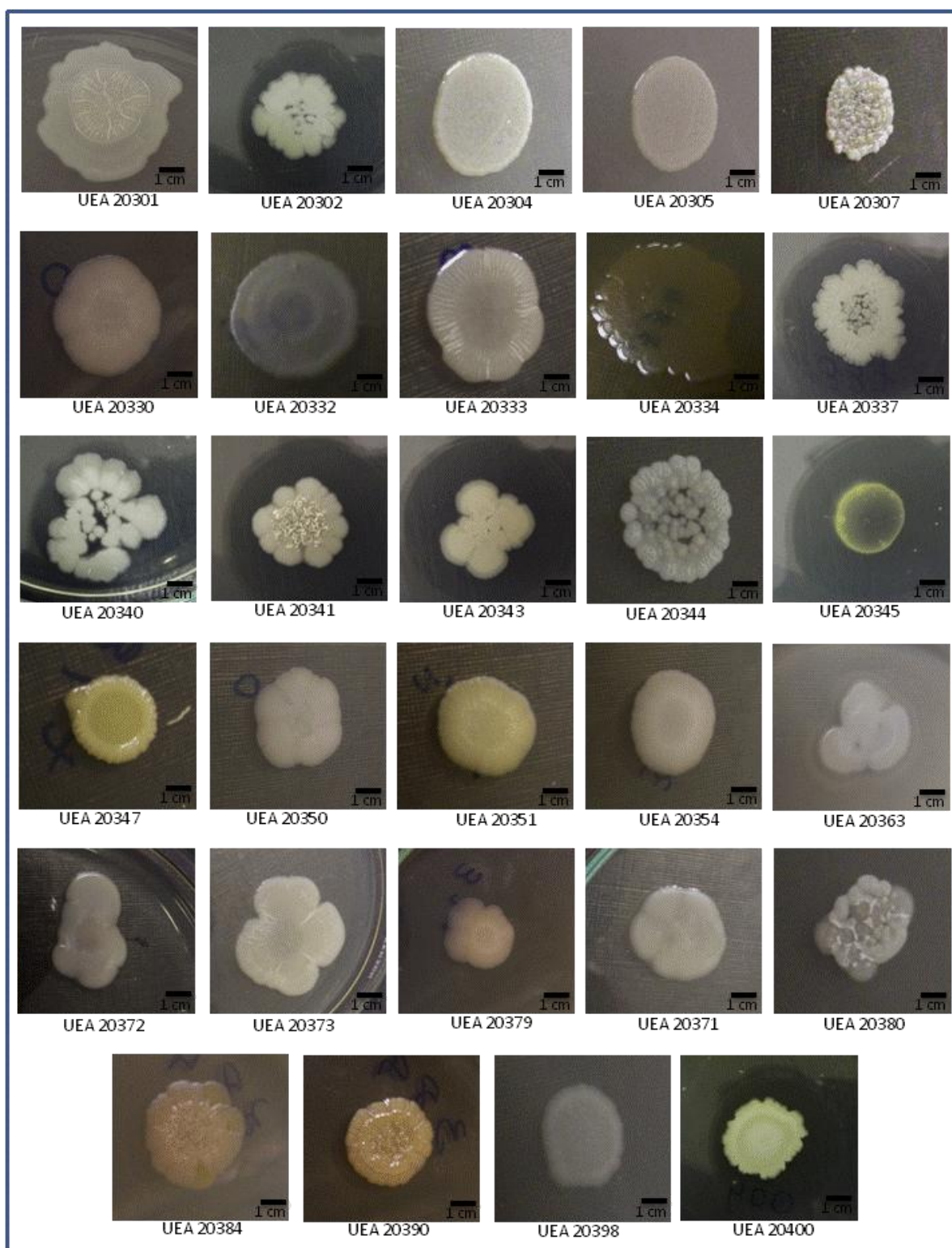


Figura 5. Imagem de colônias bactérias isoladas das esponjas e crescidas em meio de cultura sólido NA, depois de 24h de incubação

A técnica de identificação molecular utilizando a amplificação da região ribossomal 16S do DNA bacteriano permitiu identificar oito gêneros. As sequências obtidas foram comparadas com sequências do banco de dados público GenBank através do programa BLASTn (NCBI-www.ncbi.nih.gov), para a identificação com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA, e os resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Identificação das bactérias isoladas a partir de esponjas de água doce com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA

Código coleção	Espécie cuja sequência apresentou maior similaridade através de BLASTn	Máximo de Identidade (%)	Score	Valor E	Acesso no Genbank com maior identidade
UEA 20301	<i>Paenibacillus</i> sp.	96%	512	9,00E-142	JF825471.1
UEA 20302	<i>Enterobacter</i> sp.	98%	1301	0.0	EF429007.1
UEA 20304	<i>Enterobacter</i> sp.	98%	1254	0.0	EF429007.1
UEA 20305	<i>Enterobacter</i> sp.	97%	1272	0.0	FJ527677.1
UEA 20307	<i>Enterobacter</i> sp.	99%	1272	0.0	EF489445.1
UEA 20330	<i>Bacillus cereus</i>	95%	529	1,00E-146	AM162320.1
UEA 20332	<i>Bacillus</i> sp.	95%	898	0.0	FJ601649.1
UEA 20333	<i>Delftia</i> sp.	87%	978	0.0	EU252493.1
UEA 20334	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	95%	1018	0.0	HQ418842.1
UEA 20337	<i>Bacillus</i> sp.	96%	931	0.0	EU184084.1
UEA 20340	<i>Bacillus</i> sp.	98%	1299	0.0	EU531542.1
UEA 20341	<i>Lysinibacillus</i> sp	97%	931	0.0	HM055765.1
UEA 20343	<i>Delftia</i> sp	99%	1330	0.0	FJ378038.1
UEA 20344	<i>Bacillus</i> sp.	99%	1335	0.0	AY461751.2
UEA 20345	<i>Bacillus</i> sp.	98%	1278	0.0	JN082261.1
UEA 20347	<i>Lysinibacillus</i> sp	98%	1283	0.0	JF738141.1
UEA 20350	<i>Bacillus</i> sp.	99%	1319	0.0	EU531540.1
UEA 20351	<i>Delftia</i> sp.	91%	1034	0.0	FJ192961.1
UEA 20354	<i>Bacillus</i> sp.	98%	1310	0.0	EU236738.1
UEA 20363	<i>Bacillus</i> sp.	89%	1056	0.0	FJ601631.1
UEA 20371	<i>Enterobacter</i> sp.	89%	1064	0.0	HQ189499.1
UEA 20372	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	1278	0.0	JN426990.1
UEA 20373	<i>Bacillus</i> sp.	98%	1315	0.0	FJ785497.1
UEA 20379	<i>Lysinibacillus</i> sp.	99%	1314	0.0	HM055765.1
UEA 20380	<i>Pseudomonas</i> sp.	86%	937	0.0	FJ527669.1
UEA 20384	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	1281	0.0	HM755671.1
UEA 20390	<i>Enterobacter</i> sp.	92%	1074	0.0	HM485592.1
UEA 20398	<i>Lactococcus</i> sp.	98%	1254	0.0	JN251778.1
UEA 20400	<i>Bacillus</i> sp.	89%	351	3,00E-93	HM489982.1

De forma simplificada e separada por gêneros, a tabela 3 pode ser mais bem entendida na figura 6, onde os gêneros *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. mostraram-se os mais abundantes e apresentaram frequências de 37,9% e 20,7% respectivamente. Em estudo realizado por Parfenova et al.(2008) no lago Baikal, Rússia, também com esponjas de água doce, observou a presença de bactérias

do gênero *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* com frequência de 22,37% e 15,8% respectivamente, enquanto que no presente estudo a frequência do gêneros foi de 37,9% e 10,3% respectivamente.

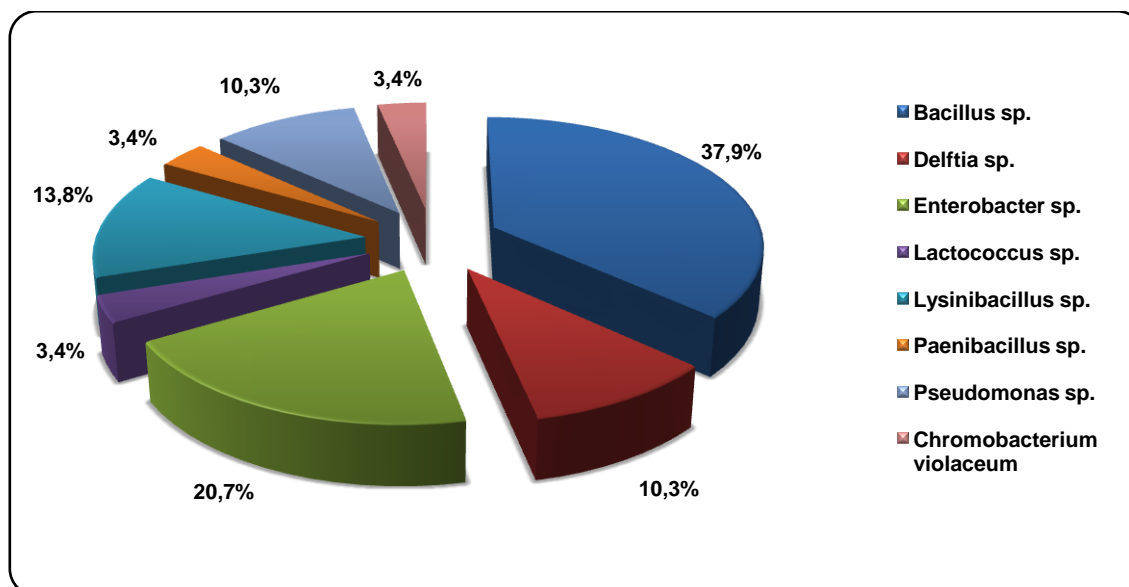


Figura 6: Frequência dos gêneros de bactérias isoladas de esponjas de água doce.

4.2 REAÇÃO DE BIORREDUÇÃO

Para a reação de biorredução foram utilizados três tipos de substrato: a *p*-nitroacetofenona, acetofenona e ácido 3-hidroxi-2-metileno-3-(4'-nitrofenil) propanoato de metila. Os gêneros utilizados como biocatalisadores foram: *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sphaericus* que foram isolados de esponjas de água doce da Amazônia. Em estudo realizado por Andrade et al.,(2005), cepas do gênero *Bacillus* biorreduziram derivados de acetofenonas após 72h de reação. Essa característica foi importante para a seleção das três bactérias isoladas das esponjas.

Na reação de redução com a *p*-nitroacetofenona as três cepas de bactérias foram anteriormente crescidas durante 48h em meio NA. Após 24h adicionou-se o substrato (*p*-nitroacetofenona) e foi retirada uma alíquota para analisada no CG.

Após 24h, as três cepas bacterianas apresentaram um sinal com tempo de retenção em 13 minutos (Figura 8, 9 e 10) diferentemente do tempo de retenção do padrão racêmico que foi entre 6,5 e 7,0 minutos (Figura 7), não ocorrendo

assim a formação esperada de alcoóis racêmicos pela redução da carbonila presente no substrato, contudo houve a formação de um novo produto.

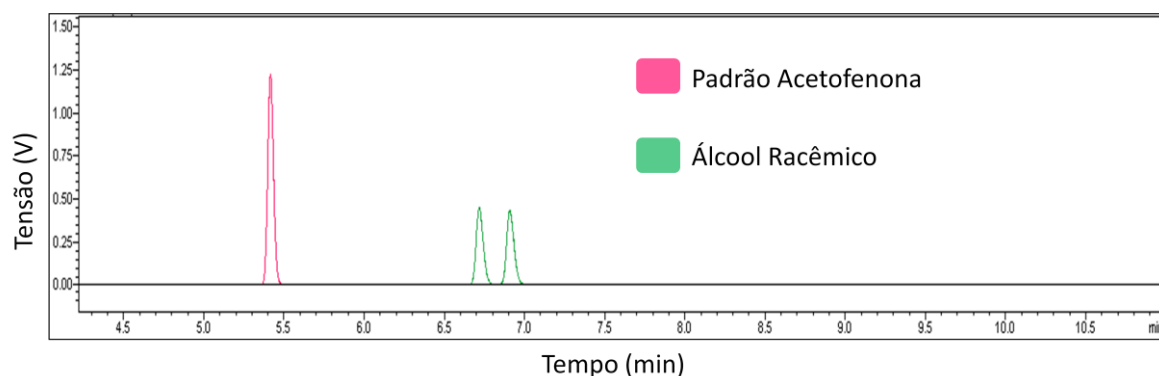


Figura 7: Cromatograma em CG-quiral dos padrões Acetofenona e Álcool racêmico

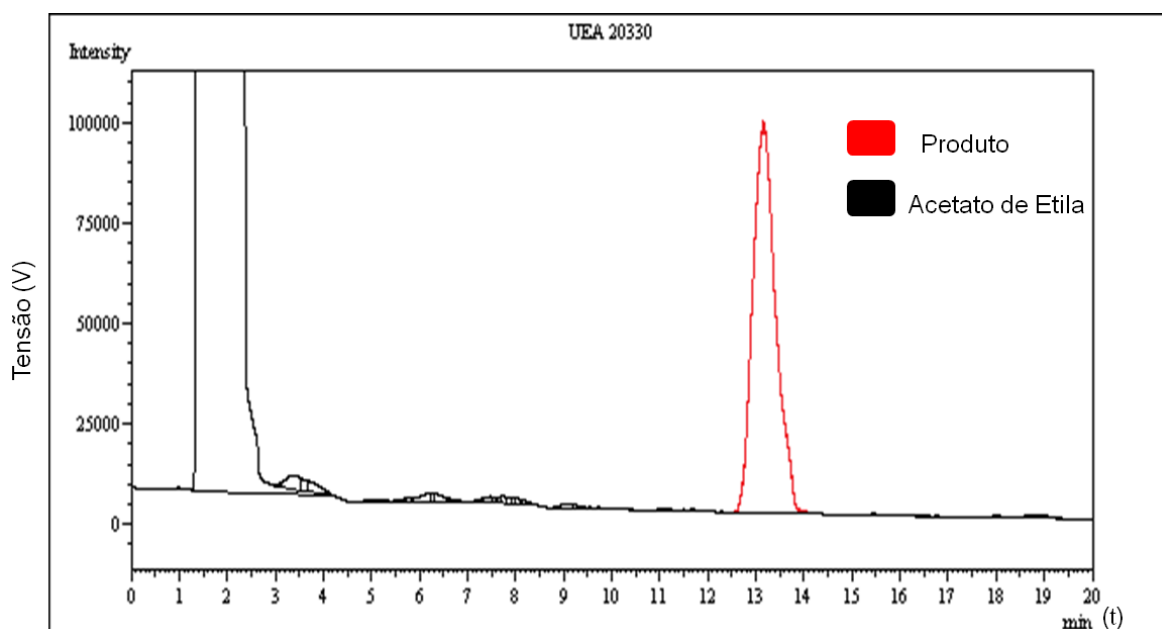


Figura 8: Cromatograma em CG-quiral da redução da *p*-nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20330 (*Bacillus*), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM

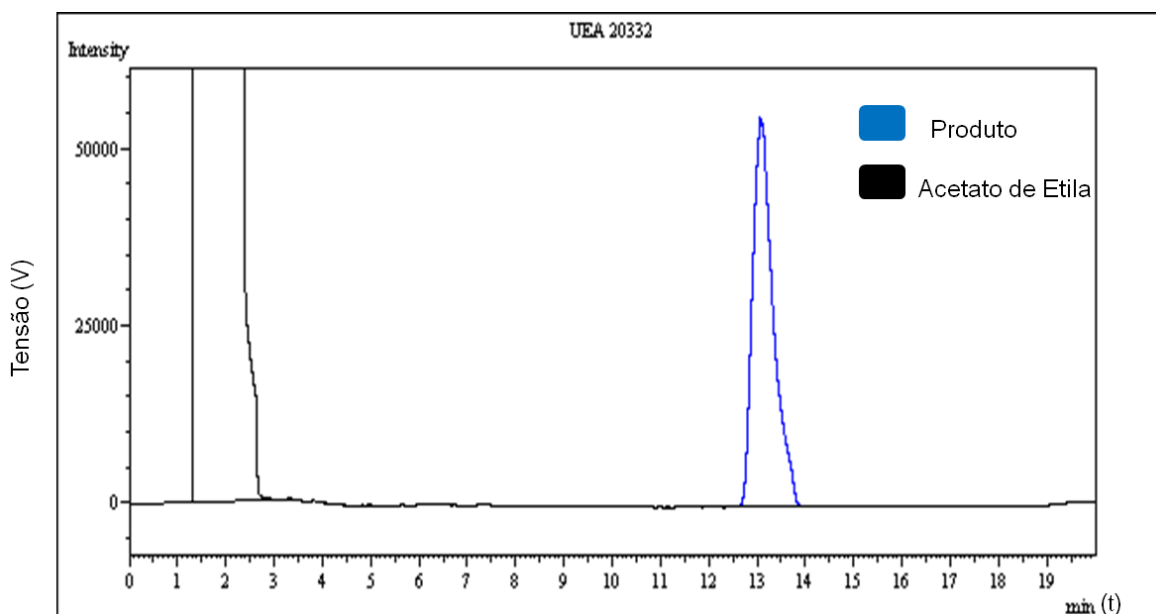


Figura 9: Cromatograma em CG-quiral da redução da *p*-nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20332. (*Bacillus*), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM

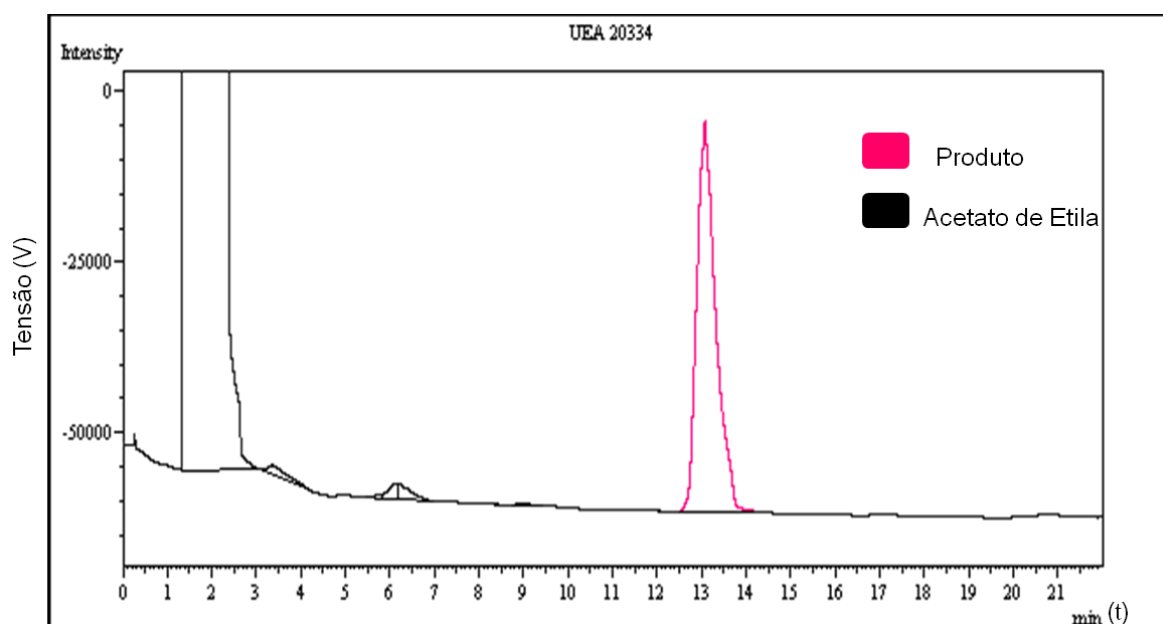


Figura 10: Cromatograma em CG-quiral da redução da *p*-nitroacetofenona utilizando a cepa de bactéria UEA 20334 (*Lysinibacillus*), isolada de esponjas de água doce no Município de Parintins/AM

Assim, a fim de identificar preliminarmente o novo produto foram realizadas análises em CG/EM. Segundo os cromatogramas das análises (Figura 11 A e B) o composto produto obtido apresentou o tempo de retenção em 20 minutos. A comparação do perfil das fragmentações de massa do produto com os dados da biblioteca do equipamento (Wiley 229. LIB), sugeriu que o composto

formado foi a 4-aminoacetofenona com 95 % de similaridade (Figura 11 C), então, pode-se observar que houve a redução do grupo nitro (NO_2) para o grupo amina (Figura 12). Provavelmente, a bactéria produziu enzimas ativas, do tipo nitroreductas, que teve preferência em reduzir o grupo nitro e não a carbonila, sugere-se que esta reação de biorredução foi quimiosseletiva (FABER, 2004; ROCHA, 2008).

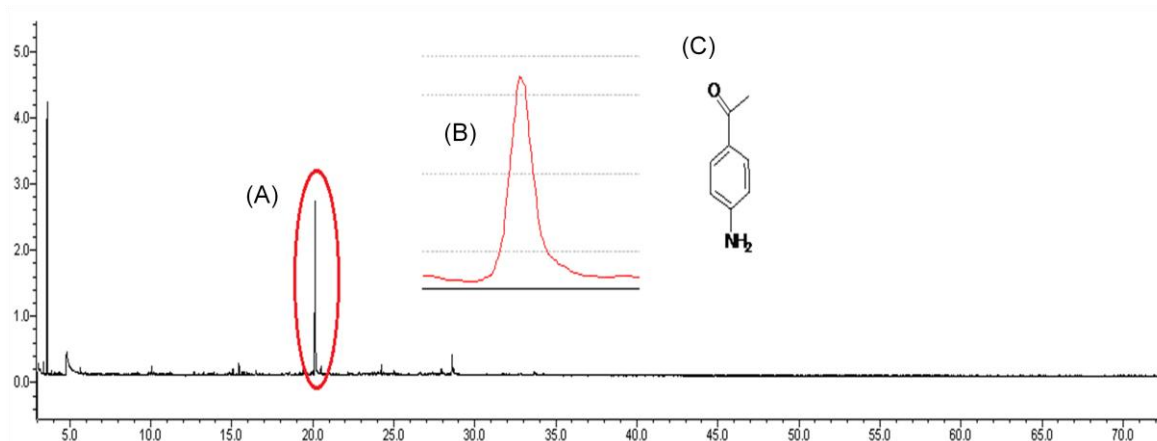


Figura 11: Representação do Cromatograma do CG-Massa. (A) pico majoritário referente a substancia obtida reação de biocatálise; (B) ampliação do pico majoritário presente no cromatograma; (C) estrutura sugerida pelo programa (nome do programa e biblioteca) do produto formado a partir da redução da *p*-nitroacetofenona obtida com a utilização de cepas de *Bacillus*, *Bacillus* e *Lysinibacillus*.

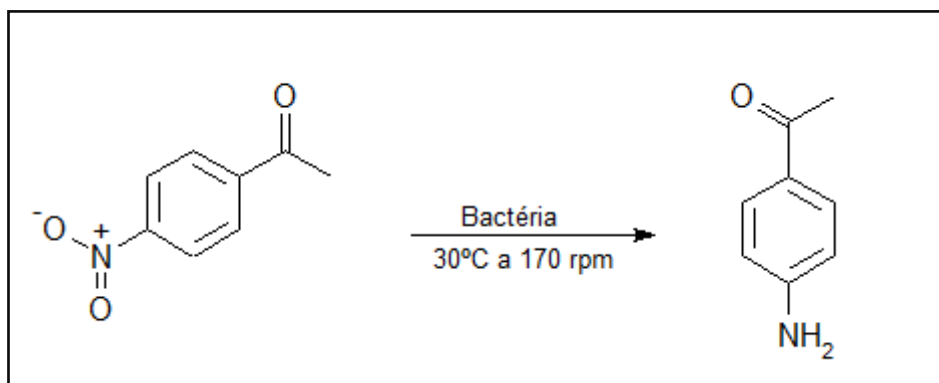


Figura 12: Esquema de reação para a biorredução da *p*-nitroacetofenona utilizando bactérias

Na figura 13 pode-se observar que a reação com o substrato acetofenona após sete dias não houve formação de produtos. Sugerindo a ausência de desidrogenase ativa para esse substrato.

Na reação de redução do substrato ácido 3-hidroxi-2-metileno-3-(4'-nitrofenil) propanoato de metila, constatou-se que após sete dias de reação não houve biotransformação de seus grupos funcionais. Este fato, pode ser explicado pelo maior volume do grupo substituinte na posição 1 do composto B na figura 14, impedindo assim a interação necessária entre o substrato e a enzima nitroreductase, resultado contrário ao obtido utilizando o substrato A que apresenta grupo substituinte na posição 1, porém de menor volume conforme a figura 14.

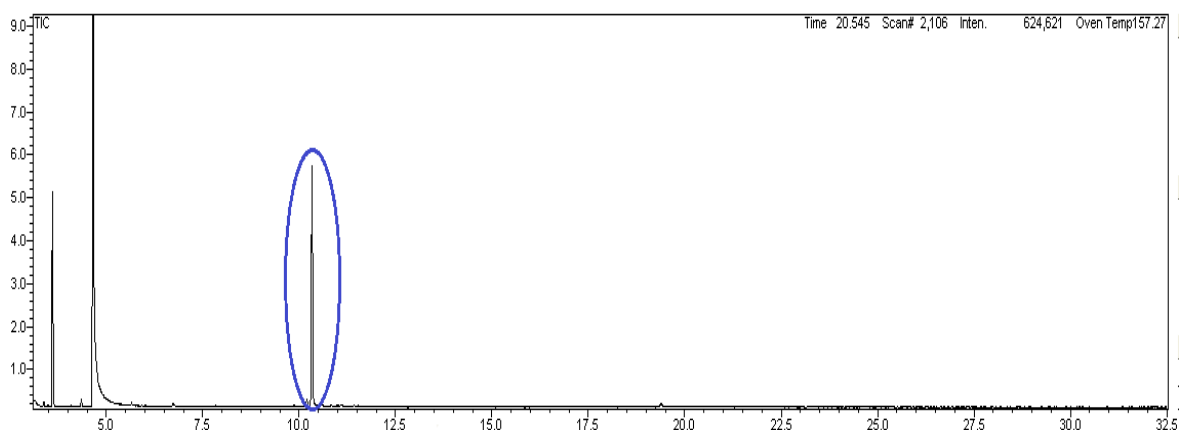


Figura 13: Representação do Cromatograma do CG-Massa do sinal da Acetofenona

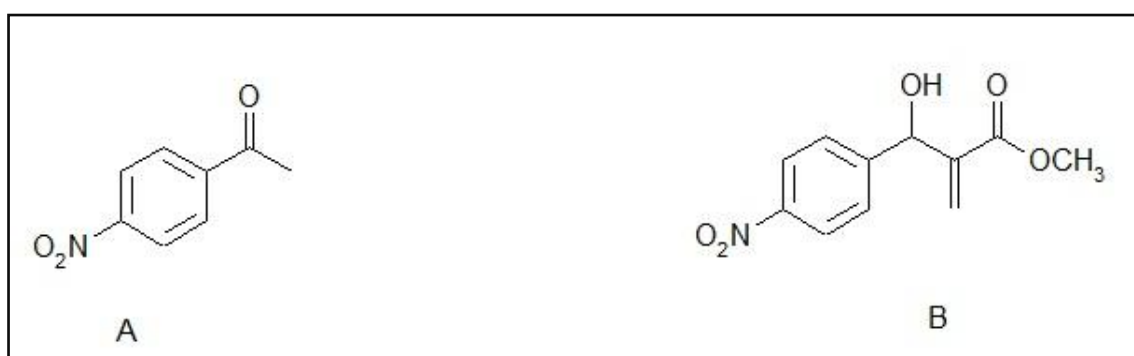


Figura 14: Representação das moléculas utilizadas como substrato

CONCLUSÕES

Os métodos empregados permitiram isolar e purificar 217 isolados bacterianos associados às esponjas de água doce de rios da amazonia;

Através da extração de DNA dos isolados bacterianos foi possível o sequenciamento das amostras pelo gene 16 rDNA.

Análises das sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA possibilitaram a identificação de oito gêneros isolados. São eles: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Delftia sp.*, *Lysinibacillus sp.*, *Lactococcus sp.* e *Chromobacterium violaceum*.

Das 30 estirpes isoladas, 11 são do gênero *Bacillus sp.*, sendo que não houve diferença entre os isolados com assepsia e sem assepsia.

Com a caracterização das bactérias associada às esponjas criou-se uma coleção inicial.

As cepas UEA 20330 (*Bacillus cereus*), UEA 20332 (*Bacillus sp.*) e UEA 20334 (*Lysinibacillus sphaericus*) apresentaram potencial para biorredução de cetonas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMIAN, A. L. Methods in Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations. BARREDO, J. L. (ed.); Humana Press Inc., Totowa, NJ , vol. 17, cap 1, 2005.

AICHER, T. D.; BUSZEK, K. R.; FANG, F. G.; FORSYTH, C. J.; JUNG, S. H.; KISHI, Y.; MATELICH, M. C.; SCOLA, P. M.; SPERO, D. M.; YOON, S. K. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. **J. American Chemical Society**, v. 114, n. 8, p. 3162-3164, 1992.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANAND, T. P.; BHAT, A. W.; SHOUCHE, Y. S.; ROY, U.; SIDDHARTH, J.; SIDDHARTHA, P. S. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters of the coast of South East India. **Microbiological Research**. v.161, p.252-262, 2006.

ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; RODRIGUES, D. F.; PELLIZARI, V. H.; PORTO, A. L. M.; Enantioselective reduction of ortho – substituted acetophenones by bacterial strains isolated from medium enriched with biphenyl or diesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**. v.33, p.73-79, 2005.

ARILLO A.; BAVESTRELLO G.; BURLANDO B.; SARA M. Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: a possible mechanism. **Marine Biology**. v. 117, p. 159–162, 1993.

BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, 2009.

BEER, S.; ILAN, M. In situ measurements of photosynthetic irradiance responses of two Red Sea sponges growing under dim light conditions. **Marine Biology**. v. 131, p.613-617, 1998.

BEWLEY C. A.; HOLLAND, N. D.; FAULKENER, D. J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 52, n. 7, p. 716-22, 1996.

BRUSCA R.C; BRUSCA G. J. **Phylum Porifera: the sponges Invertebrates**. Massachusetts: Sinauer, 1990.

CANHOS, V. P; MANFIO, G. P; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARE, V. H. Diversidade no Domínio Bactéria. In: Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. (orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1999.

CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J. Microrganismos em favor da saúde humana. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 9, n. 11, p. 77-81, 2008.

CIHANGIR, N., ; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 20, p.193–197, 2004.

COHAN, F. M. Bacterial Species and Speciation. **Systematic Biology**, vol. 50, n. 4, p. 513-524, 2001.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 564-82, 1999.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VAS, F.; **Biocatalysis- From discovery To Application** . cap. 1, p. 200, 1999,

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3ª edição, Berlin, Springer- Verlag, 2004.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Report**, n. 17, p. 7-55, 2000.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Report**, n. 19: 1-48, 2002.

GALM, U.; SHEN, B. Natural Product Drug Discovery: The Times Have Never Been Better. **Chemistry Biology**, n. 14, p. 1098-1104, 2007

GELSOMINO, R; Vancanneyt M.; Vandekerckhove, T.M e Swings J. Development of a 16s rRNA primer for the detection of *Brevibacterium* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 532-535, 2004.

GILBERT, J. J.; Allen, H. L. Chlorophyll and primary productivity of some green freshwater sponges. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**. v. 58, p.633–658, 1973.

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

HAWKER, L. E.; LINTON, A. H.; FOLKES, B. F.; CARLILE, M. J. An introduction to the biology of micro-organisms. London, 1960.

HENTSCHEL, U.; Usher, K. M.; Taylor, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS Microbiology Ecology**, Wien, v. 55, p. 167–177, 2006.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied Environmental Microbiology**. v.68, p.4431– 4440, 2002.

HOLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F.; KOENIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUST, H. J, SCHULZ, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**. v. 104, p.1354–1365, 2000.

HOOPER, J. N. A. & VAN SOEST, R. W. M. **Systema Porifera: a guide to the classification of sponges**, v1. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002

IMHOFF J.F; STÖHR, R.. Sponge-associated bacteria. In: Müller WEG, editor. **Marine molecular biotechnology**, New York: Springer-Verlag, 2003.

KIM, M. K. KIM, H. S.; KIM B. O.; YOO, S. Y.; SEONG, J. H.; KIM, D. K.; LEE, S. E.; CHOE, S. J.; PARK, J. C.; MIN, B. M.; JEONG, M. J.; KIM, D. K.; SHIN, Y. K.; KOOK, J. K. Multiplex PCR using conserved and specific-specific 16S rDNA primers for simultaneous detection of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 110-115, 2004.

LEE, O. O.; WONG, Y. H.; QIAN, P. Y. Inter – and Intraspecific Variation of Bacterial Communities Associated with Marine Sponges from San Juan Island, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, n.11, p. 3513-3521, 2009.

LEHMKUHL, A. L. Biorredução da 4-Aminoacetofenona Catalisada por Células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. em sistemas bifásicos. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina, 2006.

LEHNINGER, A. L. N, D.L; **Princípios da Bioquímica**. 5^o ed., São Paulo: Sarvier, 2011.

LI, C.W.; CHEN, J.Y. & HUA, T.E.. Precambrian Sponges with Cellular Structures. **Science**, v. 279, p. 879–882.1998.

LI, ZHIYONG. Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical Metabolites. **Marine Drugs**. v.7, p.113-129, 2009.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16s and 23s rRNA sequence analysis. **FEMS Microbioloy Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MAGNINO G.; SARA A.; LANCIONI T.; GAINO E. Endobionts of the coral reef sponge *Theonella swinhoei* (Porifera, Demospongiae). **Invertebrate Biology**. v. 118, p.213–220, 1999.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia: Fundamentos. Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, Rio de Janeiro, 2009.

MANCONI, R; PRONZATO, R.: Sub-order *Spongillina* *subord. nov.*: Freshwater sponges. In Hooper, J.N.A. & R.W.M. Van Soest, **Systema Porifera: A guide to the Classification of Sponges**, New York, Kluwer Academic/Plenum Publ. p. 921-1019, 2002.

MENEZES, C. B. A.; BANUGLI – SANTOS, R. C. MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANATTI – GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponge from the North coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**. v. 165, p.466-482, 2010.

MÜLLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 8, p. 450–456, 2005.

MUSCHOLL – SILBERHORN, A.; THIEL, A.; IMHOFF, J. F.; Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge – Associated Bacteria from Mediterranean Sea. **Microbial Ecology**. v.55, p.94-106, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; NADER, K. M. J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

PARFENOVA, V. I; TERKINA, I. A.; KOSTORNOVA, T. Y.; NIKULINA, I. G.; CHHERNYKH, V. I.; MAKSIMOVA, E. A. Microbial Community of Freshwater Sponges in Lake Baikal. **Biology Bulletin**. v.35, n. 4, p.374-379, 2008.

PENNEY, J. T.; RACEK, A. A. **Comprehensive revision of a worldwide collection of freshwater sponges (Porifera: Spongillidae)**. *Bulletin of the United States National Museum* v. 272, p. 1-184, 1968

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 519-538, 2004

PINHEIRO, U. S.. **Contribuições à taxonomia e biogeografia das esponjas de águas continentais brasileiras**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007

PROCÓPIO, A. R. L. **Diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera de arroz resistente ao propanil e seu potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, 2007

PROCÓPIO, R. E. L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R.. Drugs from the sea current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59 p. 125-134, 2002.

RADJASA, O. K. Antibacterial activity of sponge associated – bacteria isolated from North Java Sea. *Journal of Coastal Development*. v.10, n.3, p.143-150, 2007.

RÜTZLER K. Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In: Rützler K. **New perspectives in sponge biology**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 455–466, 1990.

RÜTZLER, K. Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In: K. Rützler (ed.), **New perspectives in sponge biology**. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. p. 455–466, 1985.

SABU, A.; Nampoothiri, k. M.; Pandey, A. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 17: Microbial Enzymes and Biotransformations; Barredo, J. L. (ed.) Humana Press Inc.; Totowa, NJ, cap.4, 2005.

SANTAVY D. L.; WILLENZ P.; COLWELL R. R. Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1750–1762, 1990.

SARA M.; Liaci L. Symbiotic associations between zooxanthellae and two marine sponges of the genus *Cliona*. **Nature**. v. 203, p.321–323, 1964.

SCHMIDT, E. W.; OBRAZTOVA, A. Y.; DAVIDSON, S. K.; FAULKNER, D. J.; HAYGOOD, M. G. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel Delta-Proteobacterium Candidatus *Entotheonella palauensis*. **Marine Biology**. v. 136, p.969–977, 2000.

SEXTON A. C, MINIC Z, COZIJNSEN A. J, PEDRAS M. S. C, HOWLETT B. J A glucosyltransferase of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* detoxifies a phytoalexin, brassinin, from Brassica species. **Fungal Genetics and Biology**, n. 46, p. 201-209, 2009.

SIMPSON, T.L. **The cell biology of sponges**. Springer-verlag: New York, 1984.

SIPKEMA, D.; OSINGA, R.; SCHATTON, W.; MENDOLA, D.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 201-22, 2005.

STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacteria systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 89-106, 1991.

STEVENSON, G. B. et al. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1974.

STINSON, S.C. Chiral Drugs. **Chemical & Engineering News**, n. 72 p. 38-72, 1994.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 67, n.4, p. 491-502, 2003.

TAYLOR, M.W.; RADAX R.; STEGER D.; WAGNER, M..Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.71, n.2, p. 295–347. 2007.

THIEL, V.; IMHOFF, J. F. Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 421-423, 2003.

TURQUE, A.S, et. al. Microrganismos Associados a Poríferos: Potencial Biotecnológico da Microbiota Associada às Esponjas Marinhas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 37, p. 64-69, 2007

UNSON, M. D.; HOLLAND, N. D.; FAULKNER, D. J. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*. v.119, p.1–11, 1994.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. A quantitative map of nucleotides substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**. v. 24, p. 3381-3391, 1996.

VINCENTE, V. P. Response of sponges with autotrophic endosymbionts during the coral-bleaching episode in Puerto Rico. **Coral Reefs**. v.8, p.199–202, 1990.

VIEIRA, M. R. **Estudo da Biorredução de Compostos Carbonílicos por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina, 2006.

VOLKMER-RIBEIRO, C. Esponjas. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (orgs). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: FAPESP, 1999.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TAVARES, M. C. M. Comunidades de esponjas do bentos rochoso, dos lagos de várzea e dos lagos de hidrelétricas da bacia Amazônica. In: VI Congresso Brasileiro de Limnologia, 1997, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCAR, 1997.

VOLKMER-RIBEIRO, C. Porifera. In: Hurlbert, S.H. et al. (ed.) **Aquatic biota of tropical South America**. San Diego, CA: San Diego State University, 1981.

WILKINSON, C. R., GARRONE, G., e VACELET J. Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. Proceedings of the Royal Society of London **Series B, Biological Sciences**, v. 220, n. 1221, p. 519-528, 1984.

WILKINSON, C. R. Microbial associations in sponges. 1. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. **Marine Biology**. v. 49, p.161–167, 1978.

WILKINSON C. R. Symbiotic interactions between marine sponges and algae. In: Reisser W. **Algae and symbioses**. Biopress, Bristol, UK, pp 112–151, 1992.

WILKINSON, C.R. Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. **Symbiosis**. v.4, p.135-146, 1987.

WEBB V. L.; MAAS E. W. Sequence analysis of 16S rRNA gene of cyanobacteria associated with the marine sponge *Mycale (Carmia) hentscheli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 207, p.43–47, 2002.

WEBSTER, N. S.; WILSON, K. J.; BLACKALL, L. L.; HILL, R.T. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*, **Applied Environmental. Microbiology**, v. 67, p. 434–444, 2001.

WEISZ, J. B.; HENTSCHEL, U.; LINDQUIST, N.; MARTENS, C. S. Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Marine Biology*. v. 152, p.475-483, 2007.

WERKMAN, C. H.; WILSON, P.W. et al,. *Bacterial physiology*. New York: Academic Press, 1951.