

MARIANA ALVES ROQUE DE MORAES

Bactérias associadas à esponja *Hymeniacidon heliophila*: papel fisiológico e aplicação na biotecnologia

Bacteria associated with the sponge *Hymeniacidon heliophila*:
physiological role and application in biotechnology

São Paulo

2022

MARIANA ALVES ROQUE DE MORAES

**Bactérias associadas à esponja *Hymeniacidon*
heliophila: papel fisiológico e aplicação na biotecnologia**

Bacteria associated with the sponge *Hymeniacidon*
heliophila: physiological role and application in biotechnology

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis
Custódio

Coorientador: Prof. Dr. Enrique
Eduardo Rozas Sanchez

São Paulo

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:

Moraes, Mariana A R

Bactérias associadas à esponja *Hymeniacidon heliophila*: papel fisiológico e aplicação na biotecnologia / Mariana A R Moraes ; orientador Márcio Reis Custódio ; coorientador Enrique Eduardo Rozas Sanchez -- São Paulo, 2022.

96 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. *Hymeniacidon heliophila*. 2. Bactérias associadas. 3. 2,4,6-Triclorofenol. 4. Esponjas marinhas. 5. Biotecnologia. I. Reis Custódio, Márcio, orient. II. Rozas Sanchez, Enrique Eduardo, coorient. III. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação: Elisabete da Cruz Neves - CRB -
8/6228

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio
Orientador

Ao meu amor, Leonardo.
Sempre comigo na alegria
e no estresse.

Aos meus pais, Ana e Marco.
Os alicerces que me mantêm
de pé mesmo a distância.

Agradecimentos

Aos meus pais Ana e Marco por sempre estarem ao meu lado me orientando e me acalentando. Vocês são minha inspiração de força e perseverança.

Ao meu marido Leonardo, desenvolvedor mobile que agora sabe tudo de esponjas marinhas. Acordar comigo as cinco da manhã de um sábado para coletar esponja num calor de 13°C é só um milésimo de todo o apoio que tem me dado. Obrigado por sempre acreditar em mim e me ajudar nas minhas empreitadas malucas.

Ao meu orientador Márcio que recebeu essa “carioca” sem preconceitos e dividiu comigo todo seu conhecimento. No dia que te conheci entre todas as perguntas você pareceu achar uma coisa boa eu ter tido problemas nos experimentos da minha iniciação científica e não ter desistido, fui para casa com aquilo na cabeça sem entender, mas depois de um ano trabalhando com esponjas entendi que trabalhar com esponjas não é para corações fracos (Custódio). Muito obrigado por toda paciência e pelos puxões de orelha merecidos.

Ao meu coorientador Enrique, que teve uma paciência enorme de me ensinar tudo que sei sobre cultivo de bactérias. Obrigada por me responder dúvidas até aos domingos, por repetir frases sempre que eu não entendia oportunhol, por confiar no meu trabalho e por me confortar e orientar quando necessário.

Minha gratidão a todos os meus amigos é imensurável, amo cada um do seu jeitinho. Em especial agradeço aos meus amigos que me acompanharam e apoiaram nessa jornada, a Liv por me aceitar como sou, por todo o carinho e pelo exemplo de mulher que ela é, a Michele e o Gabriel eu nunca vou poder agradecer por todo o apoio, lamentos, risadas e cachaças que dividimos, a Priscila que teve a paciência e o carinho de me ensinar tudo que sabia quando cheguei ao laboratório e Vinicius muito obrigada por me ajudar desde o primeiro momento e por estar sempre ali disposto a me ensinar algo ou tomar uma cervejinha. A Profa. Dra. Cristiane Haridoim por toda a ajuda, por todo conhecimento dividido, pelas conversas e por ser uma inspiração. Todos vocês fizeram de São Paulo um lar para mim.

À Profa. Dra. Anita por toda a paciência, ajuda e confiança no meu trabalho. Ao Claudio Oller por permitir o uso de seu laboratório sem restrições, onde foram realizados alguns dos meus experimentos mais importantes. Ao Prof. Dr. Federico pelas ótimas imagens obtidas através de seu microscópio e pela paciência e ajuda. À Profa. Dra. Michelle Klautau e seus alunos que me receberam com todo carinho em seu laboratório.

Não posso deixar de agradecer ao “Seu” Vagner pelas conversas, o bom humor e por me salvar várias vezes com seus ajustes técnicos para meus pedidos de última hora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, sem as quais esse projeto não teria sido possível.

Afinal, o que é um cientista? É um homem curioso olhando por um buraco de fechadura, o buraco de fechadura da natureza, tentando saber o que está acontecendo.

Jacques-Yves Cousteau

Lista de Figuras

Figura 1 – a) Visão interna do sistema aquífero de uma demospongia típica. b) Ampliação de uma região com câmara coanocitária. A água do mar entra através das pequenas aberturas inalantes (ostios ou poros) na pinacoderme e percorre todo o corpo da esponja devido ao fluxo criado pelos movimentos flagelares dos coanócitos. (imagem de Hentschel et al., 2012)..... 16

Figura 2 - Diagrama de uma Demospongiae. No mesohilo, existem microrganismos simbiotes de vida livre (sm), bem como bacteriócitos (ba) que hospedam estes microrganismos. Estas células hospedam microrganismos simbióticos (sm) no ambiente intracelular (ie), em uma vesícula (ilustração retirada de Carrier et al., 2022). 20

Figura 3 – Bacteriócito (bc) de Lycopodina hypogea em microscopia eletrônica de transmissão. A célula apresenta várias vesículas que podem conter as bactérias simbiotes (ib), um núcleo (n) e na parte superior está ocorrendo a fagocitose (psdp) de um fragmento de tecido pré-digerido (ivb) (Godefroy et al., 2019). 21

Figura 4 – Fragmento da esponja Hymeniacion heliophila mantido no aquário após ser coletado no Araçá, São Sebastião - SP. 26

Figura 5 – Esquema em 2D de uma molécula de triclorofenol (TCP), poluente emergente com potencial de risco a saúde humana (imagem: Sigma-Aldrich). 28

Figura 6 – A) Meio para a cultura com a solução de TCP (100 ppm), mostrando a aparência incolor e translúcida; B) Sobrenadante do meio extraído após sete dias de cultura com a bactéria isolada da esponja, apresentando turbidez e a coloração amarelada..... 38

Figura 7 - Diagrama de Venn da relação das vias do controle e tratado. Das vias encontradas quatro são detectadas apenas no controle, 26 vias são comuns a ambos e as bactérias do tratado apresentam 18 novas vias..... 42

Figura 8 - Variação do impacto das vias metabólicas entre as culturas tratadas (vermelho) e as controle (rosa), mostrando que houve alteração de impacto em todas as vias comuns. Destas, dez tiveram seu impacto aumentado com a

exposição ao TCP, enquanto sete foram reduzidas e apresentaram impacto maior no controle. 42

Figura 9 – A comparação dos valores de probabilidade de significância da via (p bruto), entre as vias comuns das cepas tratadas (vermelho) e das controle (rosa), revela 21 vias com aumento na significância após a exposição ao TCP e 5 vias com baixa na probabilidade de significância. 43

Figura 10 – Espectro protéico das cepas *Enterobacter* sp. (A) e *Shewanella* sp (B), obtidos por espectrometria de massa, mostrando os diferentes perfis utilizados para a identificação no BIOTYPER. 45

Figura 11 – Placa com a cepa B1. Algumas das características similares entre as cepas B1, B3, B4, B5 e B6 são colônias esbranquiçadas, opacas e com uma protuberância no centro. 46

Figura 12 – Sequências forward e reverse obtidas do gene 16S rRNA da cepa B1, isolada de esponja coletada em São Sebastiao – SP, que demonstrou capacidade de degradar TCP. 47

Figura 13 – Sequências forward e reverse do gene 16S rRNA das cepas com colônias similares a B1 e isoladas de esponjas coletadas no Rio de Janeiro e Santos. 49

Figura 14 (página anterior) - Árvore filogenética das cepas com morfologia similar mostrando que todas as cepas isoladas (setas) estão enquadradas dentro de um mesmo clado com a *Bacillus velezensis*. 51

Figura 15 – Dois tipos de bacteriócitos encontrados nos citocentrifugados de *Hymeniacidon heliophila* (Tricromo de Mallory). A - duas células sendo uma não identificada (CD) e a outra é um bacteriócito (BC) com o citoplasma repleto bactérias com aspecto de bacilos (BB) ao redor do núcleo (N) (A); B – bacteriócito com bactérias filamentosas (BF) ao redor do núcleo (N). 52

Figura 16 – Duas imagens de células em suspensão coradas com DASPEI. A maioria das células (C) mostra o citoplasma com coloração difusa ou concentrada em poucas vesículas, com o núcleo mais escuro sem marcação. Os bacteriócitos (B) têm o citoplasma fortemente corado, não sendo possível identificar a região do núcleo (barra de escala 10 μ m). 53

Figura 17 – Estrutura em 2D da molécula de 3,5-Di-tert-butylphenol, subproduto proveniente da degradação de TCP pela bactéria associada (imagem: Sigma-Aldrich)..... 55

Figura 18 – Interação dos microrganismos associados à esponja presentes no mesohilo. O metabolismo de nitrogênio dos simbiontes é ligado com a reciclagem de amônia secretada pelas esponjas e as interações envolvendo o metabolismo do enxofre e do carbono. Todas estas vias foram encontradas na análise do metabolismo da bactéria degradadora de TCP (imagem: Zhang et al. 2019). 56

Figura 19 – Resultados do FISH em quimiobacteriócitos de Haliclona sp. (Tianero et al., 2019). Se comparada com a coloração com DASPEI utilizada por nós vemos resultados muito similares. Da esquerda para a direita: imagem de campo claro; Coloração DAPI (azul); hibridização com as sondas eubacterianas universais EU338 I, II e III (vermelho); hibridização com Ca. E. renieramycinifaciens utilizando a sonda CE75 específica para esta bactéria (verde); Composição dos sinais verde e vermelho, mostrando sua co-localização (amarelo). 61

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Parâmetros utilizados na análise das vias pelo programa MetaboAnalyst</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 2 - Toxicidade dos metabólitos do sobrenadante das culturas expostas ao TCP (PubChem)</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 3 - Toxicidade dos metabólitos do controle.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4 – Valores do score obtido na identificação com o BIOTYPER.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 5 – Relação das cepas sequenciadas com os locais de coleta das amostras</i>	<i>47</i>
<i>Tabela S1 - Resultado da análise das vias metabólicas controle</i>	<i>79</i>
<i>Tabela S2 - Resultado da análise de vias metabólicas tratado</i>	<i>80</i>
<i>Tabela S3 – Resultado da análise cromatográfica do controle.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela S4 – Resultado da análise cromatográfica do tratado</i>	<i>85</i>

Sumário

Resumo	13
Abstract.....	14
1.0 Introdução	15
1.1. Esponjas marinhas	15
1.2. Microbiota associada a esponjas e seu papel	17
1.3. Potencial biotecnológico dessas associações	22
1.4. Efeitos da poluição marinha nas esponjas e aplicações biotecnológicas	23
1.5. A esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i>	25
2.0 Objetivos	29
3.0 Material e Métodos	30
3.1. Escolha da espécie e coleta	30
3.2. Cultura in vitro das células da esponja	30
3.3. Isolamento das bactérias resistentes	31
3.4. Teste de degradação do TCP.....	31
3.5. Análise cromatográfica e perfil metabólico.....	32
3.6. Identificação das cepas.....	33
Maldi-TOF-MS.....	33
Extração de DNA e sequenciamento dos genes codificadores para o 16S rRNA	33
Análise filogenética	34
3.7. Caracterização e localização da microbiota associada nos bacteriócitos	35
4.0 Resultados	37
4.1. Seleção das cepas resistentes e teste de degradação	37
4.2. Identificação das cepas resistentes.....	43

Espectrometria de massa (BYOTYPER).....	43
Sequenciamento do 16S rRNA	45
4.3. Localização das bactérias nas células das esponjas	51
5.0 Discussão.....	54
5.1. Seleção e teste de degradação.....	54
5.2. Identificação das cepas resistentes ao TCP	57
5.3. Localização da bactéria no meio intracelular das esponjas.....	59
6.0 Conclusões	62
7.0 Referencias bibliográficas	63
8.0 Material suplementar.....	79

Resumo

Esponjas marinhas (Filo Porifera) são representantes atuais dos primeiros animais multicelulares, sendo organismos sésseis e filtradores que ocupam uma ampla variedade de sistemas aquáticos. Também são reconhecidas por abrigarem uma importante comunidade de microrganismos associados, cujas cepas podem ser espécie-específicas e fundamentais em diversos processos fisiológicos dos seus hospedeiros, como a nutrição e defesa. Esses microrganismos podem estar também relacionados à sobrevivência de algumas espécies de esponja em ambientes com altos níveis de poluição, como no caso de *Hymeniacidon heliophila*. Sendo filtradoras, as esponjas tendem a acumular diversos poluentes, e a microbiota pode ter atuação na detoxificação destes compostos tóxicos. Assim, as cepas abrigadas pelas esponjas podem ser interessantes para processos de biorremediação de locais poluídos. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo identificar bactérias simbiontes capazes de degradar Triclorofenol, um poluente emergente de elevada toxicidade e altamente persistente no meio ambiente. Neste processo foi isolada uma cepa identificada como *Bacillus velezensis*, que degradou com eficiência o poluente. A análise dos subprodutos mostrou que a degradação resultou na formação de butylphenol, um composto com potencial antibiótico. Ao investigar o metabolismo da bactéria encontramos interações como a reciclagem de nitrogênio e o metabolismo de enxofre, processos que trazem benefícios a esponja. Embora não tenha sido possível localizar a cepa nos tecidos do hospedeiro, a mesma foi encontrada em esponjas coletadas em três localidades distantes. Isso indica uma relação de simbiose e um possível papel deste microrganismo na sobrevivência da esponja em ambientes com altos níveis de poluição.

Palavras-chave: *Hymeniacidon heliophila*; Triclorofenol; Bactérias associadas; Simbiose; Metabólitos secundários.

Abstract

Marine sponges (Phylum Porifera) are representatives of the first multicellular animals, being sessile, filter-feeding organisms that occupy a wide variety of aquatic habitats. They are also recognized for harboring an important community of associated microorganisms, whose strains may be species-specific and fundamental to many physiological processes in their hosts, such as nutrition and defense. These microorganisms may also be related to the survival of some sponge species in locals with high levels of pollution, as in the case of *Hymeniacidon heliophila*. As filter-feeders, sponges tend to accumulate various pollutants, and this microbiota may be involved in the detoxification of these toxic compounds. As such, the strains harbored by sponges can be interesting for bioremediation processes of polluted sites. Thus, the objective of this work was to identify symbiont bacteria capable of degrading Trichlorophenol, an emerging pollutant of high toxicity and highly persistent in the environment. In this process, a strain which degraded the pollutant efficiently was isolated and identified as *Bacillus velezensis*. Analysis of the by-products showed that the degradation resulted in the formation of butylphenol, a compound with antibiotic potential. When investigating the metabolism of the bacteria we found interactions with nitrogen recycling and sulfur metabolism, processes that bring benefits to the sponge. Although it was not possible to localize the strain in the host tissues, the same was found in sponges collected from three distant locations. This indicates a symbiotic relationship and a possible role of this microorganism in the survival of the sponge in environments with high levels of pollution.

Keywords: *Hymeniacidon heliophila*; Trichlorophenol; Associated bacteria; Symbiosis; Secondary metabolites.

1.0 Introdução

1.1. Esponjas marinhas

Esponjas (Filo Porifera) são os animais multicelulares mais antigos que existem, com origens que datam mais de 800 milhões de anos atrás (Müller, 1998). Com mais de 9.300 espécies descritas, as esponjas são agrupadas em quatro classes principais: Calcarea (8% das espécies), Demospongiae (83%), Hexactinellida (7%) e Homoscleromorpha (1%) (Van Soest *et al.*, 2018). Esses organismos são sésseis e filtradores e ocupam uma ampla variedade de sistemas aquáticos, além de influenciarem nos processos bênticos e pelágicos removendo grandes quantidades de material da coluna de água (Hooper e van Soest, 2002; Pile e Young, 2006). Dentre os diversos papéis que desempenham na comunidade bentônica temos os de servirem como substrato para colonização, abrigo e alimento para vários grupos de organismos, dessa forma colaborando com isso significativamente com a manutenção da biodiversidade (Wulff, 2001).

As esponjas são estruturalmente simples, com uma monocamada epitelial exterior (pinacoderme) envolvendo o mesohilo, que é uma região formada por células especializadas imersas numa matriz extracelular de colágeno e percorrida por uma vasta rede de canais e câmaras (Figura 1). Nestas câmaras, a água é bombeada e filtrada continuamente por células flageladas (coanócitos), que filtram e fagocitam partículas orgânicas e as transferem ao mesohilo (Simpson, 1984). Avaliando o processo de filtração e absorção de matéria orgânica de três Demospongiae tropicais, *Mycale sp.*, *Aplysina gigantea* (citada como *Verongia*) e *Tethya crypta*, foi detectado que estes organismos captam cerca de 80% da matéria orgânica particulada filtrável (Reiswig, 1971). Esta é uma das principais fontes alimentares e consiste majoritariamente de diferentes espécies de bactérias, que são retidas pelas esponjas de forma eficiente, em uma taxa média de 96,1% por número de células (Reiswig, 1971). As partículas orgânicas filtradas são digeridas intracelularmente por enzimas lisossômicas como fosfatase ácida, alfa-glicosidase, beta-hexosaminidase e catepsina D (Hahn-Keser e Stockem 1998). Outros processos fisiológicos básicos como trocas gasosas, excreção e reprodução, também são baseados neste sistema aquífero.

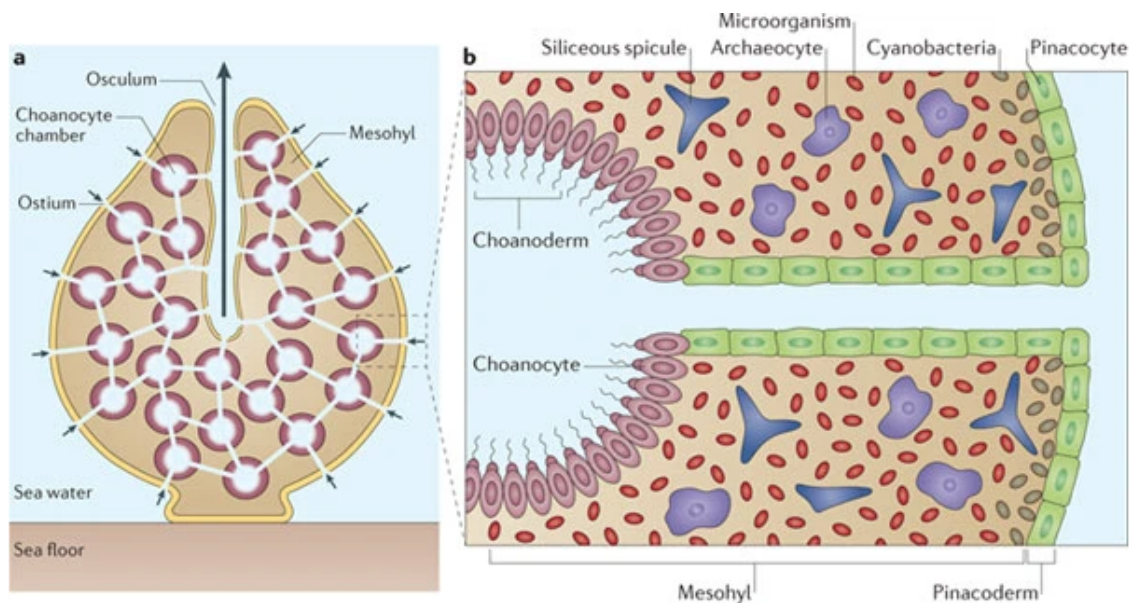


Figura 1 – a) Visão interna do sistema aquífero de uma demospongia típica. b) Ampliação de uma região com câmara coanocitária. A água do mar entra através das pequenas aberturas inalantes (ostios ou poros) na pinacoderme e percorre todo o corpo da esponja devido ao fluxo criado pelos movimentos flagelares dos coanócitos. (imagem de Hentschel *et al.*, 2012)

As esponjas também são conhecidas como o organismo mais prolífico, dentre toda a diversidade biológica, por fornecerem moléculas bioativas ou com estruturas incomuns (Carroll *et al.*, 2021 e demais revisões desta série). Milhares de produtos naturais foram isolados de esponjas e, embora relativamente poucos desses compostos tenham sido estudados por suas funções ecológicas, alguns são conhecidos por servirem como defesas químicas contra predadores, microrganismos, organismos incrustantes e outros competidores (Paul *et al.*, 2019). Dentre esses compostos estão presentes enzimas como ATP N-glicosidase, descoberta em *Axinella polypoides*, que converte adenosina-5'-tri-fosfato (ATP) em adenina e ribose-5-trifosfato (Reintamm *et al.*, 2003); o ácido clátrico, um terpenóide bicíclico, que foi isolado de *Clathria compressa* e que apresentou atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina e à vancomicina (Gupta *et al.*, 2012). Alguns desses compostos encontrados em produção nas esponjas se mostraram uma fonte de novas moléculas para processos de interesse industrial (e.g. Schröder *et al.*, 2007; Inbakandan *et al.*, 2010). No entanto, o fornecimento de biomassa de esponjas para aplicações industriais é extremamente limitado pela baixa quantidade de estoques naturais e pelo fato de o cultivo em massa de muitas espécies

de esponjas de interesse não estarem disponíveis (Hausmann *et al.*, 2006). Contudo, os extratos obtidos de esponjas marinhas em geral consistem em uma coleção de metabólitos secundários que são sintetizados pelas esponjas e por seus simbioses (He *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020). Tendo em vista que microrganismos podem apresentar facilidades no cultivo em quantidades maiores, estudos recentes têm explorado as simbioses presentes nas esponjas com o intuito de conhecer melhor as funções da microbiota associada e sua possível aplicação na biotecnologia.

1.2. *Microbiota associada a esponjas e seu papel*

Os invertebrados bentônicos compreendem uma grande proporção da biomassa dos recifes e costões rochosos, e desempenham um papel central no acoplamento de nutrientes bentônico-pelágicos como mencionado anteriormente sobre as esponjas (Caliman *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019). A limitação de alguns nutrientes pode ter favorecido o surgimento de simbioses que acompanham esses invertebrados em escala de tempo evolutiva (Zhang *et al.*, 2019). Sendo assim, o sucesso evolutivo e ecológico obtido pelos poríferos pode estar em parte relacionado à íntima associação com seus microrganismos simbioses, de acordo com a teoria do hologenoma que considera o hospedeiro e sua microbiota como uma única unidade evolutiva (Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008). Para manter essas associações as esponjas inicialmente devem ter se tornado capazes de diferenciar as bactérias alimentares dos seus próprios simbioses, como observado na espécie *Aplysina aerophoba* (Wehrl *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, os microrganismos também devem ter evoluído mecanismos para que sejam reconhecidos como simbioses em vez de alimento (Nguyen *et al.*, 2014), ou ainda para evitar que o hospedeiro os detecte (Burgsdorf *et al.*, 2015). Todas essas estratégias evolutivas têm como resultado preservar associações que podem fornecer benefícios mútuos. Dentre os diversos benefícios que o holobionte pode obter estão a ciclagem do nitrogênio (Hoffmann *et al.*, 2009; Schläppy *et al.*, 2010; Maldonado *et al.*, 2012) e a produção de metabólitos secundários bioativos (Taylor *et al.*, 2007).

Nas esponjas estes simbioses consistem em uma grande diversidade de grupos, com bactérias heterotróficas, anaeróbios facultativos, arqueias, vírus dinoflagelados, cianobactérias, leveduras, fungos e diversos outros microeucariotos (Webster e Hill, 2001; Schippers *et al.*, 2012, Nascimento-Silva *et al.*, 2022). Destes

grupos, o principal em termos quantitativos e de pesquisa são as bactérias, cujas interações simbióticas são muito específicas (Varijakzhan *et al.*, 2021). A importância dessas relações pode ser ilustrada pelo fato destes microrganismos associados poderem representar até cerca de 40% do volume de algumas esponjas (Vacelet, 1975; Taylor *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2012, Paul *et al.*, 2019). No entanto, outros grupos de esponjas apresentam quantidades bem menores de bactérias, e essa característica aparenta ter um caráter sistemático (Hentschel *et al.*, 2006). Este fato levou à proposta de uma classificação distintiva: *Low Microbial Abundance* (LMA), para as esponjas cujo microbioma tem densidade próxima ao encontrado na água do mar circundante; e *High Microbial Abundance* (HMA) - anteriormente chamadas de *bacteriosponges* - que possuem densidades de duas a quatro ordens de magnitude maiores do que o observado em esponjas LMA (Hentschel *et al.*, 2006; Azam e Malfatti, 2007; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017).

Uma porção significativa destas cepas simbiotes é distinta daquelas encontradas na água do mar ou no sedimento, e se mantém estável ao longo do tempo e de grandes distâncias geográficas (Hentschel *et al.*, 2002; Hentschel *et al.*, 2006). Exibem também um alto grau de especificidade em relação aos hospedeiros (Hentschel *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2010), podendo haver diferenças mesmo entre espécies de esponjas taxonomicamente próximas (Montalvo *et al.*, 2011). Investigações sobre esta especificidade exploraram a existência de uma cepa com similaridade de apenas 75% na sequência do gene 16S rRNA com filios bacterianos conhecidos (Fieseler *et al.*, 2004). Com base nos dados foi sugerido a implementação de um novo filo candidato, denominado "Poribacteria", para reconhecer a afiliação da nova bactéria com as esponjas (Fieseler *et al.*, 2004). Além disso, é sabido que várias das cepas específicas possuem uma longa relação ancestral com seus hospedeiros (Taylor *et al.*, 2007), desempenhando papéis na aquisição de nutrientes, produção de defesa química e atividade anti-incrustante (Hentschel *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007).

As interações químicas e os processos de sinalização celular entre as células das esponjas e os microrganismos tornaram-se muito complexos ao longo desta relação evolutiva. Isto contribuiu para um metabolismo secundário rico e diversificado em esponjas, que contém vários compostos ativos e materiais de interesse biotecnológico (Ehrlich *et al.*, 2010). Observando mais detalhadamente as comunidades bacterianas é possível identificar que estas possibilitam aos

hospedeiros uma expansão de seu repertório nutricional, fornecendo acesso a fontes inorgânicas e nutrientes dissolvidos (Paul *et al.*, 2019). Além de atuar na digestão e nutrição das suas hospedeiras, a vasta microbiota encontrada nas esponjas também apresenta envolvimento nos processos de proteção com a produção de compostos deterrentes à predação (Garate *et al.*, 2015), ou pela metabolização de substâncias tóxicas diversas, como poluentes (Perez *et al.*, 2002) e metais (Rozas *et al.*, 2017; Rozas *et al.*, 2019).

Dada a sua importância e o longo tempo de relações evolutivas, as populações simbiotes são mantidas nas esponjas sob um controle quantitativo e qualitativo bastante estrito (Hentschel *et al.*, 2006). A maioria dos microrganismos associados a esponjas habitam o mesohilo, a matriz extracelular que é ocupada por células especializadas e que constitui a maior parte do corpo das esponjas (Figura 2). Outros microrganismos podem ainda ser encontrados no interior de células específicas, os *bacteriócitos*, onde estão dispostos em cápsulas ou mesmo no citoplasma destas células (Vacelet e Donadey, 1977). Os bacteriócitos já foram observados em diversas esponjas marinhas, mas a identidade e função dos simbiotes bacterianos que nelas residem foram raramente determinadas (Vacelet e Donadey, 1977; Maldonado, 2007).

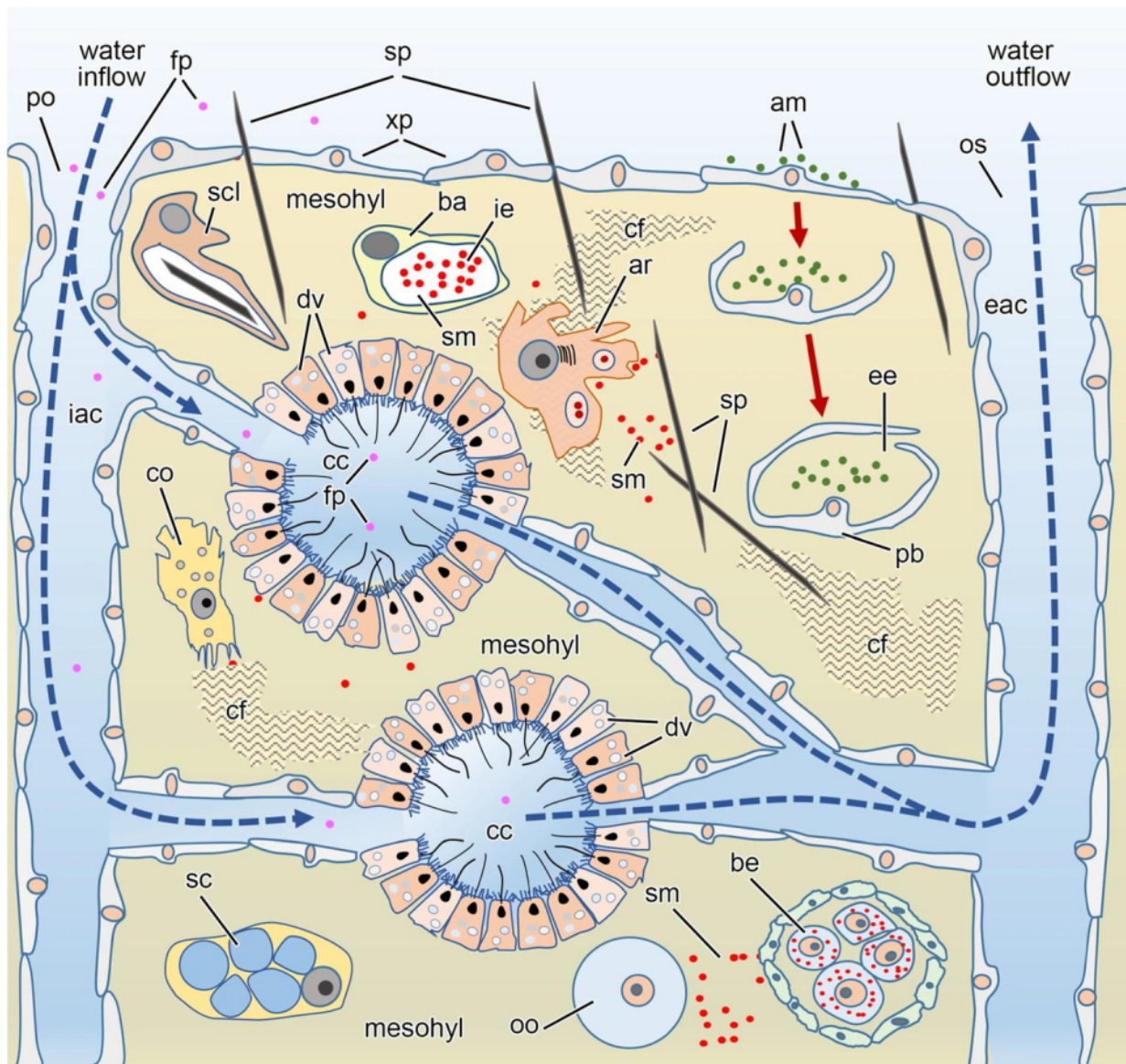


Figura 2 - Diagrama de uma Demospongiae. No mesohilo, existem microrganismos simbiotes de vida livre (sm), bem como bacteriócitos (ba) que hospedam estes microrganismos. Estas células hospedam microrganismos simbióticos (sm) no ambiente intracelular (ie), em uma vesícula. Outro tipo é o bacteriócito de bolso, derivado de uma célula epitelial que atrai microrganismos de vida livre (am) do ambiente para a superfície da esponja. Em seguida, a célula deixa o epitélio para entrar no mesohilo (setas vermelhas), dobrando-se para formar uma cavidade extracelular na qual os microrganismos são mantidos (ee). (legenda - am: microrganismo do ambiente, ar: arqueócito, ba: bacteriócito, be: embriões incubados, cc: câmaras coanocitárias, cf: fibrilas de colágeno, co: colênitos, dv: vesículas digestivas, eac: canais aquíferos exalantes, ee: ambiente extracelular, fp: partículas nutrientes, iac: canais aquíferos inalantes, ie: ambiente intracelular, oo: oócitos, os: ósculo, pb: bacteriócito de bolso, po: poros, sc: esferulócito, scl: esclerócitos, sm: microrganismo simbiote, sp: espículas, xp: xopinacócitos (ilustração retirada de Carrier et al., 2022).

Os estudos sobre as esponjas carnívoras têm demonstrado o papel importante que estes bacteriócitos desempenham para estes animais. Na espécie carnívora *Lycopodina hypogea* (Vacelet e Duport, 2004, citada como *Asbestopluma*), por exemplo, foi observada a associação com uma bactéria endocítica que é mantida no interior de bacteriócitos (Figura 3). Esta cepa produz enzimas que são liberadas pelo bacteriócito no meio extracelular e participam da pré-digestão das presas capturadas (Vacelet e Duport, 2004). Essa digestão degrada a presa em fragmentos menores, que são então fagocitados em poucas horas pelos próprios bacteriócitos ou por arqueócitos diferenciados em células digestivas (Godefroy *et al.*, 2019). Como as comunidades bacterianas associadas às esponjas carnívoras não são muito diferentes das esponjas filtradoras (Godefroy *et al.*, 2019), os bacteriócitos devem apresentar funções similares ou podem estar envolvidos em outros processos relacionados nas esponjas filtradoras.

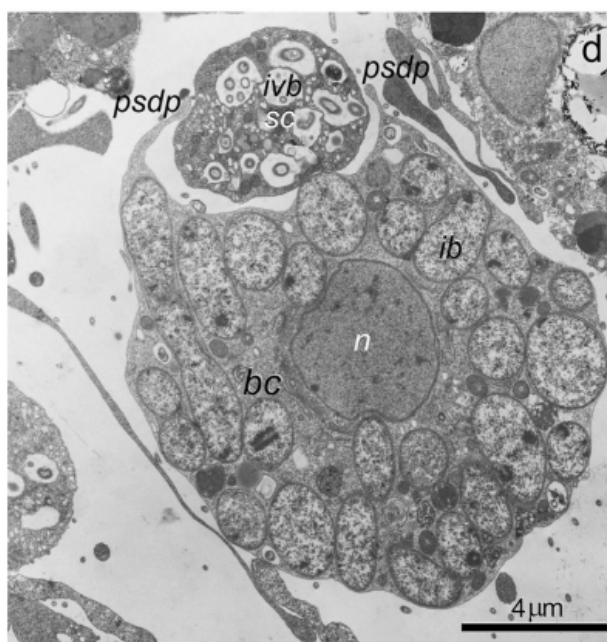


Figura 3 – Bacteriócito (bc) de *Lycopodina hypogea* em microscopia eletrônica de transmissão. A célula apresenta várias vesículas que podem conter as bactérias simbióticas (ib), um núcleo (n) e na parte superior está ocorrendo a fagocitose (psdp) de um fragmento de tecido pré-digerido (ivb) (Godefroy *et al.*, 2019).

1.3. Potencial biotecnológico dessas associações

Os ciclos eficientes de nutrientes mediados por microrganismos simbióticos com seus hospedeiros são vitais para apoiar a alta produtividade de diversos ecossistemas, como por exemplo recifes de corais (Zhang *et al.*, 2019). Parte significativa desses ciclos pode ser feita pelas esponjas marinhas, importantes organismos formadores de habitat e boas competidoras na comunidade bentônica, e que abrigam simbioses microbianas abundantes (Zhang *et al.*, 2019). A importância ecológica e evolutiva dessas associações entre esponja e microrganismo pode ser ilustrada pela sua capacidade de produzir vários compostos bioativos, que podem ser de alto interesse para a indústria de biotecnologia (Perdicaris *et al.*, 2013). No entanto, apesar da microbiota ter começado a ser extensivamente estudada neste sentido, ainda existem muitas limitações e restrições à sua utilização direta, que envolvem fatores como a falta de conhecimento sobre variações espaciais, temporais e/ou das suas interações com os hospedeiros. É surpreendente o quão pouco se sabe sobre muitos dos aspectos fundamentais da biologia dos simbioses de esponjas, particularmente nas áreas relacionadas ao metabolismo e a evolução dessas relações (Taylor *et al.*, 2007).

Contudo, o fato de mais de 8.000 moléculas complexas terem sido isoladas de esponjas marinhas, sugere que a biossíntese de metabólitos de esponjas derivada de microbiomas é um fenômeno generalizado e amplamente inexplorado (Carroll *et al.*, 2021). Em oposição aos primeiros estudos, nos quais extratos totais das esponjas eram utilizados, este potencial tem estimulado cada vez mais a busca de componentes particulares das esponjas; novos metabólitos ou processos voltados para funções específicas. Semelhanças estruturais foram detectadas entre vários compostos ativos obtidos de esponjas marinhas e de microrganismos terrestres, o que indica que as bactérias associadas a esponjas podem ser as principais fontes de alguns dessas moléculas (Wang, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Laport *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2010). Isso pode ser exemplificado pela ampla gama de componentes com atividades antibióticas isolados a partir de microrganismos associados a esponjas, que têm se tornado uma fonte importante para novas moléculas (Santos-Gandelman *et al.*, 2014; Graça *et al.*, 2015; Hoppers *et al.*, 2015). Diversos destes têm atividades contra patógenos resistentes a tratamento e doenças negligenciadas e já foram caracterizados molecularmente, como o pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro

(Kiran *et al.*, 2018), o naftaceno glicosídeo (Reimer *et al.*, 2015), a kocurina (Palomo *et al.*, 2013) e a saadamicina (El-Gendy *et al.*, 2010). Na recente pandemia causada pelo vírus SARS CoVid-2, esponjas e seus microrganismos foram uma das fontes pesquisadas na busca de compostos antivirais. Isto também resultou na descoberta de novas moléculas, como é o caso de um terpenóide da esponja marinha *Cacospongia mycofijiensis*, que mostrou uma atividade inibitória duas vezes maior que os compostos baseados em peptídeos conhecidos (Sepay *et al.*, 2021).

A síntese desses compostos bioativos de interesse realizada por simbiontes de esponja vem sendo relatada em diferentes áreas geográficas, como Galway, na costa oeste da Irlanda, Mar da China, Mediterrâneo, Caribe e Okinawa (Kennedy *et al.*, 2009; Blunt *et al.*, 2012; Bibi *et al.*, 2017). Estas áreas têm vários grupos de pesquisa atuantes e historicamente um bom nível de conhecimento da fauna de esponjas local. Em contraste, as espécies da costa do Brasil ainda são muito pouco estudadas em relação às possibilidades biotecnológicas do filo, portanto possuem um bom potencial a ser explorado.

1.4. Efeitos da poluição marinha nas esponjas e aplicações biotecnológicas

Além da obtenção de metabólitos de interesse farmacológico, as esponjas e sua microbiota podem ter muitas outras aplicações como no estudo de impactos antrópicos. Resíduos gerados por atividades urbanas, industriais e agrícolas acabam alcançando rios, lagos e eventualmente o ambiente marinho (Syafrudin *et al.*, 2021). Isto expõe áreas estuarinas e costeiras à contaminação por produtos químicos, substâncias orgânicas ou metais (Mahaut *et al.*, 2013), que se acumulam em quase todos os organismos marinhos (Abdel-monem *et al.*, 2013; Baquiran *et al.*, 2020). Por serem sésseis, se alimentarem por filtração, terem uma alta sensibilidade às mudanças ambientais e serem abundantes em ecossistemas bentônicos, as esponjas foram propostas como bioindicadores para poluição (Mahaut *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014). Além disso, são capazes de reter particulado em escalas nanométricas, e já foram utilizadas para a detecção de contaminação por microplásticos (Celis-Hernández *et al.*, 2021), um resíduo para o qual a atenção dos pesquisadores tem se voltado nos anos recentes. No entanto, são capazes também de acumular compostos dissolvidos. Já foi relatado altas concentrações de poluentes nos tecidos destes animais, incluindo organoclorados (Perez *et al.*, 2003), radionuclídeos (Patel *et al.*,

1985), e hidrocarbonetos (Zahn *et al.*, 1981). Estes organismos demonstram também ser uma excelente ferramenta para o monitoramento da poluição por metais pesados em ambientes costeiros (Carballo *et al.*, 1996; Cebrian *et al.*, 2003, 2006; Venkateswara Rao *et al.*, 2009). Um exemplo ilustrativo desta capacidade é a espécie *Haliclona tenuiramosa*, na qual foi observado que indivíduos que vivem em áreas impactadas por ação antropogênica acumulam metais pesados (As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn e Ni) em concentrações variando de 2 a 17 vezes maior do que as detectadas na água do ambiente (Venkateswara Rao *et al.*, 2009). Essa exposição a metais pesados pode trazer danos como a necrose tecidual em diversas espécies de esponjas, mas em outras mais resistentes é refletida em alterações na abundância da microbiota, indicando a participação dos microrganismos associados na sobrevivência dos animais (Webster *et al.*, 2001; Selvin *et al.*, 2009). Embora a mudança na composição da microbiota associada influencie na interação simbiótica (Toby Kiers *et al.*, 2010) ainda é vago o conhecimento sobre o quanto essa microbiota simbiote pode ser afetada, se pode haver uma adaptação da microbiota ou mesmo a troca por simbiotes mais resistentes.

Esta capacidade das esponjas e das suas microbiotas de resistirem a poluentes pode fornecer uma ferramenta adicional para a resolução destes problemas. É sabido que estes animais têm a capacidade não só de acumular metais pesados e outras moléculas perigosas, mas também realizam a degradação de diversas substâncias tóxicas, incluindo hidrocarbonetos e pesticidas (Guo e Wen, 2021; Marzuki *et al.*, 2021; Marzuki *et al.*, 2022). Este processo, a biorremediação, tem sido uma tendência mundial, principalmente para metais pesados e poluentes persistentes (Dash *et al.*, 2013). Basicamente, visa a busca de cepas, ou consórcios de microrganismos que tenham a capacidade metabólica de degradar elementos tóxicos em compostos orgânicos simples. Para chegar a este fim, diferentes abordagens podem ser utilizadas. Uma delas é testar culturas já estabelecidas frente às novas substâncias a serem degradadas (e.g. Govarthanan *et al.*, 2017; Nedoroda *et al.*, 2021). No entanto, linhagens isoladas nem sempre têm a mesma riqueza encontrada no ambiente natural, dado às dificuldades de estabelecer culturas viáveis, em particular daquelas cepas que têm interações com hospedeiros (Lavy *et al.*, 2014). Outra estratégia é buscar no ambiente dos locais impactados, já que organismos que se adaptaram em locais poluídos devem possuir as vias que permitem a sua sobrevivência (e.g. Perpétuo *et al.*, 2020; Shariati *et al.*, 2022). Neste caso, os

problemas podem ser relativos à complexidade da mistura poluente que afeta o local e das relações entre a microbiota nativa, que nem sempre podem ser repetidas (Bala *et al.*, 2022). Outra abordagem que pode ser empregada, e que pode ser especialmente promissora no caso de microrganismos simbiotes como no caso das esponjas, é pré-selecionar as cepas que seriam mais resistentes ou viáveis. Isto é feito pela exposição de um microbioma a altos níveis da substância a ser metabolizada, ou fornecer este componente como única fonte de carbono. No caso de organismos simbiotes de esponja, esta última abordagem tem dado alguns bons resultados, com várias cepas capazes de metabolizar cobre metálico sendo isoladas a partir da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Rozas *et al.*, 2017; Rozas *et al.*, 2019).

1.5. A esponja *Hymeniacidon heliophila*

A Classe Demospongiae reúne 85% de todas as espécies de esponjas existentes (Hooper e Van Soest, 2002). A demospongia *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Figura 4), é uma esponja marinha encontrada em praticamente toda a costa ocidental do oceano Atlântico (Ginn *et al.*, 1998; Lerner *et al.*, 2005). Comumente chamada de esponja do sol, é abundante em ecossistemas costeiros desde o Golfo do Maine nos Estados Unidos até Santa Catarina no Brasil (Turque *et al.*, 2008). Sua presença é comum em vários habitats ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, incluindo alguns altamente poluídos como a Baía de Guanabara, em que grandes quantidades de esgoto não tratado são despejadas desde a década de 1950 (Breves-Ramos *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2009). Esta esponja pode ser encontrada na zona subtidal, em profundidades de 1 a 20 m, mas também é capaz de viver na zona intertidal, sendo exposta ao ar duas vezes ao dia na maré baixa. Parte dessa resistência provavelmente se deve a produção de compostos antioxidantes como o I-5-hidroxitriptofano, que previnem o dano celular oxidativo, uma adaptação que permite a sua sobrevivência mesmo sob alta exposição à radiação UV na zona intertidal (Lysek *et al.*, 2003).



Figura 4 – Fragmento da esponja *Hymeniacion heliophila* mantido no aquário após ser coletado no Araçá, São Sebastião - SP.

A cor desta esponja é amarela, podendo ser mais alaranjada, e a forma varia de incrustante a maciça, mas com apenas 2-3 cm de espessura no máximo. A superfície apresenta várias papilas cônicas com um ósculo na extremidade e é comum estar recoberta de detritos variados, com apenas as papilas expostas. A consistência é bem macia e o esqueleto é composto por estruturas em feixes ascendentes multiespiculares agrupados por espongina com uma arquitetura confusa no interior, tendendo a reticulado mais perto da superfície (Muricy e Hajdu, 2006). O sistema aquífero é composto por canais abundantes sem uma organização muito visível, que perfundem toda a esponja, com várias câmaras coanocitárias distribuídas no coanossoma (Hooper e Van Soest, 2002).

Esta espécie hospeda uma gama extremamente diversificada de bactérias e arqueias. A estrutura e a composição de suas comunidades de microrganismos diferem significativamente das encontradas na água do mar, consistente com estudos

anteriores relatando que as comunidades bacterianas específicas das esponjas são distintas daquelas de vida livre no ambiente (Hentschel *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2010; Reveillaud *et al.*, 2014). Em *H. heliophila*, a comunidade associada também é distinta daqueles microrganismos altamente diversificados encontrados nos sedimentos, apesar de sua estreita associação com depósitos em habitats que em geral sofrem grande influência de riachos e marés (Weigel e Erwin, 2016).

Estudos anteriores mostram que a sua microbiota é dominada pelo filo Proteobacteria, especificamente, a classe Alphaproteobacteria (Erwin *et al.*, 2011). Além disso, foi descoberta uma rara comunidade bacteriana composta de táxons únicos em hospedeiros intertidais e subtidais, e que esses grupos não estavam presentes na água do mar ou nas comunidades sedimentares (Weigel e Erwin, 2016). A esponja é também classificada como LMA, portando com baixa abundância de microrganismos, com base em observações em imagens de microscopia eletrônica de transmissão e na composição de espécies de seus microrganismos (Turque *et al.*, 2008; Erwin *et al.*, 2011). No entanto, essa microbiota relativamente reduzida é particularmente enriquecida em Cyanobacteria e Proteobacteria em comparação com outras espécies de esponja (Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017). Estas características, junto com seu hábito intertidal e ocupação de ambientes poluídos, indicam que a esponja pode abrigar cepas particulares e potencialmente interessantes para serem utilizadas na pesquisa aplicada.

Sendo assim, este estudo tem como foco investigar a microbiota da esponja *H. heliophila*. Essa esponja é encontrada em regiões com poluição acentuada tornando-a um modelo interessante para a busca por bactérias simbiotes que apresentem alguma característica de degradação de poluentes que a auxilie a sobreviver nesses ambientes hostis. Para alcançar esse objetivo foi selecionado um composto organoclorado da família dos clorofenóis, o 2,4,6-Triclorofenol (TCP). O TCP apresenta elevada toxicidade e propriedades carcinogênicas, sendo altamente persistente no meio ambiente (Huff, 2012). Por isso encontra-se listado como um poluente prioritário a ser monitorado nas águas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (ATSDR, 2017) e pela Comissão Européia (Díaz-Díaz *et al.*, 2009; Ramos-Ramírez, 2015). No Brasil a Resolução CONAMA Nº 357 de 18 de março de 2005 estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, incluindo o TCP, e a 45 Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde determina padrões de potabilidade para substâncias químicas que representam risco

à saúde, sendo $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ o limite máximo permitido para o TCP em água de consumo humano (CONAMA, 2005; Ministério da Saúde, 2011). Esse composto pode ser produzido para fins industriais, ou ser formado indiretamente através da desinfecção por cloração da água potável (Tai e Jiang, 2005). Durante o tratamento de água, a combinação da matéria orgânica presente no meio aquoso com o cloro, gera subprodutos indesejáveis (Pianowski e Janissek, 2003; Gopal *et al.*, 2007) como o TCP. Essas moléculas apresentam grande resistência a tratamentos físico-químicos e biológicos, necessitando-se, assim, de alternativas que possam degradar, proporcionando a geração de produtos menos tóxicos ou preferencialmente mineralizar, esses poluentes (Benitez *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2016).

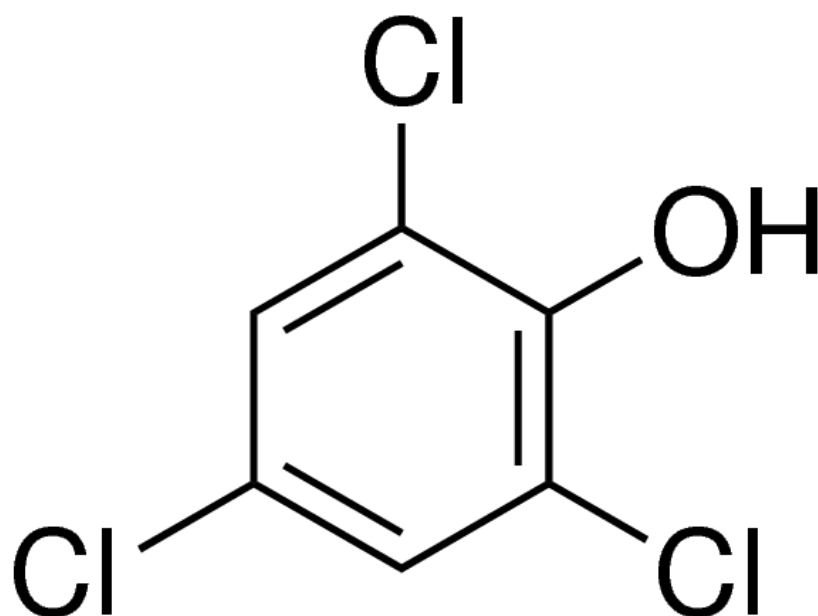


Figura 5 – Esquema em 2D de uma molécula de triclorofenol (TCP), poluente emergente com potencial de risco a saúde humana (imagem: Sigma-Aldrich).

2.0 Objetivos

Explorar associações entre a esponja *Hymeniacidon heliophila* e bactérias que contribuem para sua sobrevivência em ambientes poluídos, usando a exposição ao 2,4,6-Triclorofenol (TCP) como modelo. Para investigar essas associações foram selecionados os seguintes aspectos:

- Isolar das esponjas cepas bacterianas resistentes ao TCP;
- Definir se as cepas são capazes de degradar o TCP;
- Caracterizar e identificar as cepas selecionadas nas células ou tecidos das esponjas;
- Investigar a presença de cepas iguais ou similares em diferentes localidades.

3.0 Material e Métodos

3.1. Escolha da espécie e coleta

A espécie *Hymeniacidon heliophila* (Halichondrida: Demospongiae) foi selecionada por ser comum em locais poluídos, onde outras esponjas não sobrevivem. Além disso, esta espécie apresenta bacteriócitos (Custódio *et al.*, 2004), se mantém relativamente bem em aquários de circuito fechado, sem recirculação de água do mar, e foi objeto de trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisas (e.g. Custódio *et al.*, 2004; Rozas *et al.*, 2011; Rozas *et al.*, 2017). Foram realizadas coletas em três localidades diferentes: Praia do Itararé (São Vicente, SP, -23°97'76,46" S, -46°36'90,79" O); Mangue do Araçá, no Canal de São Sebastião (São Sebastião, SP, -23°81'70,50" S, -45°40'70,18" O) e na Mureta da Urca, no interior da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro, RJ, -22°94'33,67" S, -43°16'00,87" O). Os indivíduos foram coletados quando expostos ao ar durante a maré baixa (-0,1 a 0,2) em vários períodos: abril e agosto de 2018, janeiro e novembro de 2019, março e outubro de 2020, fevereiro e março de 2022 (São Sebastião), outubro de 2018, dezembro de 2019, novembro de 2021 (São Vicente), março de 2019 (Rio de Janeiro). Após a coleta, os animais foram transportados em caixas térmicas resfriadas a 18°C até o Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos (LABCEL) ou Laboratório de Biologia de Porifera (LaBiPor), no caso das esponjas coletadas na Urca. No laboratório, os indivíduos permaneceram em um aquário por um período de 24h para a aclimação antes dos experimentos.

3.2. Cultura *in vitro* das células da esponja

As esponjas foram dissociadas em água do mar artificial sem cálcio e magnésio, suplementada com EDTA (CMFSW+E: 460 mM Na Cl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 8.2 - Dunham e Weissmann, 1986) de acordo com Custódio *et al.* (1998). Para isso, os espécimes foram limpos de outros organismos ou detritos e recortados em fragmentos de 2 mm, que foram mantidos em CMFSW+E (5:1 v/v) por 30 minutos em agitação leve. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado novo CMFSW+E nos tubos, que permaneceram mais 45 minutos em agitação leve. Ao final, o sobrenadante foi filtrado em uma malha de nylon (100 µm) e centrifugado a 180 x g por 10 minutos. O pellet

foi ressuspensionado em meio com água do mar natural esterilizada por filtração (0,22 µm) e suplementada com antibióticos para a remoção de bactérias transientes. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer, até obter uma solução com densidade de 1×10^8 células/mL. A suspensão de células foi então depositada em placas de cultura. Diariamente os agregados celulares formados (primorfos) foram recolhidos e lavados com água do mar estéril e transferidos para novas placas com meio novo. Após a formação dos primorfos, que ocorre entre o quarto e sexto dias de cultivo, estes eram utilizados nos demais experimentos.

3.3. Isolamento das bactérias resistentes

Os primorfos obtidos foram colocados em tubos com 1,5 mL de solução de água MilliQ e 2,4,6 - Triclorofenol (TCP, Sigma) na concentração de 100 ppm. Tubos contendo primorfos apenas em água deionizada foram usados como controle. Após uma incubação de 24h a 30°C num agitador orbital a 150 RPM, o sobrenadante foi descartado e os primorfos foram macerados com um pistilo. Os macerados foram diluídos em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI, Sigma) com NaCl 2% e mantidos incubados por 24h. Após esse período 1 mL das amostras foram diluídos de forma seriada em tubos com 5 mL de NaCl 2% e uma alíquota de 100 µL da diluição -4 foi disseminada em placas com BHI-ágar com NaCl 2%. Depois de 24h, as colônias crescidas foram coletadas com o auxílio de uma alça de inoculação e incubadas em BHI com NaCl 2% líquido por mais 24h. Posteriormente ao crescimento, as colônias foram novamente coletadas e disseminadas em novas placas com ágar para verificação da pureza das cepas.

3.4. Teste de degradação do TCP

Uma amostra de cada cepa isolada foi adicionada a um Erlenmeyer com 50 mL de meio BHI, que foi então incubado a 30° C por 48h num agitador orbital a 150 RPM. Após esse período, uma alíquota das culturas foi retirada e a absorbância medida em um espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu). As culturas que mostraram crescimento foram centrifugadas a 12.000 x g (CR22GIII. Hitachi) para a retirada total do meio. Um volume de 50 mL de solução água MilliQ com 100 ppm de TCP foi adicionado aos tubos, seguido da ressuspensão dos pellets. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi separada e disseminada em placas de ágar com BHI, que

foram incubadas por 24h a 30° C e posteriormente utilizadas para a contagem das colônias. As amostras foram mantidas a 30° C num agitador orbital a 150 RPM por sete dias, sendo que no quarto e sétimo dia, alíquotas também foram recolhidas e disseminadas em placas para posterior contagem de colônias como descrito. Ao final do experimento as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido e preservado a -20° C até as análises.

3.5. Análise cromatográfica e perfil metabólico

Os protocolos utilizados foram modificados de Cheng *et al.* (2015). Para estas análises, foram retiradas amostras de 150 µL dos sobrenadantes coletados, que foram então concentrados em um concentrador rotativo a vácuo (Vida Labconco). Em seguida, os resíduos foram extraídos em fase sólida (SPE) com Hexano, Diclorometano e Metanol, todos em grau de pureza HPLC. A cromatografia foi feita em uma coluna Supelclean LC-Florisil (Supelco), acondicionada previamente com 5 mL de Hexano. Posteriormente foram aplicados 4 mL da amostra, que em seguida foi diluída 20 vezes e analisada em triplicata em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS. CP3800-Saturn 220. Varian), com uma coluna cromatográfica DB-5MS. A análise utilizou as mesmas condições da norma ABNT NBR 13882, com temperatura do injetor de 225° C, fluxo de gás constante na coluna igual a 0,4 mL/min⁻¹ e volume de injeção de 1 µL. Foi utilizado o modo de injeção direta, sendo usado hélio ultrapuro como gás de arraste. Cada corrida cromatográfica durou um tempo total de aproximadamente 36 minutos. Os dados obtidos na cromatografia foram tratados e submetidos ao programa MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) no módulo de análise das vias metabólicas, utilizando a biblioteca de vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <https://www.genome.jp/kegg/>) para *Bacillus subtilis* e os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. Todos os metabólitos detectados foram pesquisados individualmente na base de dados do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificação de riscos potenciais à saúde e ao meio ambiente.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na análise das vias pelo programa MetaboAnalyst

Método de visualização	Gráfico de dispersão (testando recursos significativos)
Método de enriquecimento	Teste hipergeométrico
Análise de topologia	Centralidade relativa-intermediária
Metaboloma de referência	Use todos os compostos na biblioteca de vias selecionadas

3.6. Identificação das cepas

A identificação das cepas resistentes foi realizada por dois métodos distintos: espectrometria de massa com Maldi-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry*) e sequenciamento dos genes codificadores para o 16S rRNA.

Maldi-TOF-MS

As cepas isoladas foram identificadas por espectrometria de massa, em um equipamento MALDI-TOF-MS Ultra Flexreme (BIOTYPER, Bruker Daltonics), utilizando o ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico como matriz (Rozas *et al.*, 2017). Para estas análises, uma amostra das cepas isoladas crescidas em placa de BHI com ágar por 24h foi coletada por raspagem com uma alça de inoculação e ressuspendidas em etanol 75%, centrifugadas a 16.000 x g por 2 min e os sobrenadantes totalmente removidos. Os pellets foram ressuspendidos em 50 μ L de ácido fórmico 70% e em seguida foram adicionados 50 μ L de acetonitrila contendo 1% de ácido trifluoroacético a cada amostra. Os extratos foram então novamente centrifugados a 16.000 x g por 3 min e 0,8 μ L dos sobrenadantes adicionados às placas do MALDI-TOF-MS. As placas foram secas naturalmente no interior de um fluxo laminar estéril e depois 0,8 μ L da solução de matriz foi adicionada sobre cada amostra por duas vezes. A interpretação dos dados obtidos e a identificação das cepas foram realizadas utilizando o banco de dados do fabricante.

Extração de DNA e sequenciamento dos genes codificadores para o 16S rRNA

As bactérias foram cultivadas em meio BHI em NaCl 2% por 24H e posteriormente o DNA foi extraído utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit

(Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a quantidade e qualidade do DNA extraído cada uma das amostras foi analisada em um equipamento BioDrop (BioDrop) e submetida a eletroforese em gel de agarose 1% seguindo métodos padrão (Sambrook *et al.*, 1989). A amplificação por PCR foi feita com o par de primers: 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTGTTAACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991) para o gene e marcador filogenético RNA ribossomal 16S (16S rRNA). Para essa etapa foram utilizadas as seguintes condições na reação: 1x PCR Master Mix (50 unidades/mL de Taq DNA polimerase; 400 μ M de cada um dos nucleotídeos: dATP, dGTP, dCTP e dTTP e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), Promega), 2% de dimetilsulfóxido, 0,1 mg/mL de albumina de soro fetal bovino, 0,2 μ M de cada primer e 2 μ L (cerca de 30 ng) de template de DNA. O ciclo térmico utilizado consistiu em: (i) desnaturação inicial à 94° C por 5 minutos; (ii) 30 ciclos de 94° C por 1 minuto; 56° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos e, (iii) extensão final à 72° C por 10 minutos. Após a PCR, os amplicons foram checados em gel de agarose 1% para verificar se eles apresentavam o tamanho correto do gene, que é de aproximadamente 1500 pares de bases (pb). As cepas que apresentaram fragmentos de tamanho adequado e uma concentração suficiente de no mínimo 0,25 ng/ μ L foram enviadas para a empresa Biotecnologia Pesquisa e Inovação (BPI, Botucatu, SP) para o sequenciamento do gene 16S rRNA (Sanger). As sequências que foram obtidas apresentaram uma extensão variando entre 600 e 1000 pb. Foi então realizada uma checagem de seus eletroferogramas com o software Sequence Scanner V.1 (Thermo Fisher Scientific). Em alguns casos as sequências foram também editadas de forma manual, para a remoção de nucleotídeos erroneamente inseridos pelo sequenciador (Ashelford *et al.*, 2005; Esteves *et al.*, 2013).

Análise filogenética

As sequências do gene 16S rRNA obtidas foram submetidas à plataforma online SILVA rRNA database project (<https://www.arb-silva.de/>; Pruesse *et al.*, 2012). A partir da identificação obtida, todas as sequências filogeneticamente próximas disponíveis no próprio site foram baixadas. Junto a isso, sequências de outras espécies próximas e de cepas que pudessem ser usadas como grupos externos na construção de árvores filogenéticas foram buscadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul *et*

al., 1997). Para grupos externos foram usadas as sequências de cepas do gênero *Paenibacillus*: *P. glycanilyticus* (KY660598); *P. macerans* strain IAM 12467 (NR 040886); *P. polymyxa* strain IAM 13419 (NR 037006); *P. mucilaginosus* strain 1480D (NR 028675) e *P. amylolyticus* strain NRRL NRS290 (NR 025882). Um arquivo no formato FASTA foi então montado contendo todas as sequências obtidas no presente estudo; as similares e as a serem usadas como grupos externos obtidas nos bancos de dados.

As sequências foram então alinhadas usando o módulo MUSCLE do software MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2011) para a confecção de árvores filogenéticas preliminares com o objetivo de eliminar redundâncias. O modelo mais adequado foi feito no programa MEGA utilizando-se o método estatístico de Máxima Verossimilhança, com um bootstrap de 100 reamostragens aleatórias e o modelo Jukes-Cantor (Jukes *et al.*, 1969). Com a filogenia preliminar pronta, uma nova árvore foi gerada onde as redundâncias foram eliminadas e as sequências curtas que dificultam a formação de regiões de consenso foram removidas. Após a conclusão do tratamento dos dados e escolha do grupo externo, seguiu-se a análise do melhor modelo utilizando-se o programa MEGA. Para as análises apenas valores de bootstrap iguais ou superiores a 75% foram considerados, dado que valores acima de 70% estimam uma considerável confiabilidade nos nós (Hillis e Bull, 1993; Stearns e Hoekstra, 2003; Caldart *et al.*, 2016).

3.7. Caracterização e localização da microbiota associada nos bacteriócitos

Na caracterização dos bacteriócitos e das bactérias foram utilizadas técnicas de microscopia óptica e microscopia de fluorescência. Para investigar as células na microscopia óptica, os primorfos foram dissociados em CMFSW+E, as suspensões de células ajustadas para densidade de 4×10^5 células/mL e citocentrifugadas com 4×10^4 células/spot (80 x g / 5 min. Fanem 248). As lâminas foram então fixadas em vapor de formol por 45 min e coradas com três colorações diferentes: Tricromo de Mallory, Fucsina Ácida ou Azul de Toluidina (Behmer *et al.*, 1976).

Para a microscopia de fluorescência, fragmentos de esponja foram dissociados como descrito anteriormente em CMFSW+E contendo 2 µg/mL de DASPEI (2-(4-dimethylaminostyryl)-1-ethyl pyridinium iodide, Sigma), um marcador fluorescente para mitocôndrias e bactérias, por 30 minutos em agitação leve. Após este tempo, o

sobrenadante foi descartado, sendo adicionada nova solução de CMFSW+E com DASPEI nos tubos, que permaneceram mais 30 minutos em agitação leve. Ao final, o sobrenadante foi filtrado em uma malha de nylon (100 μm), e a concentração ajustada para 4×10^5 células/mL. Um volume de 100 μL dessa suspensão foi adicionado em placas de Petri com fundo de lamínula e observado em excitação/emissão em 358/461 nm em um microscópio de fluorescência (Leica DMi8 Inverted Microscope) no Laboratório de Biologia Evolutiva do Desenvolvimento (Evo-Devo. IB/USP).

Para observação das bactérias, alíquotas das culturas com densidade óptica igual a 1 de absorbância, quando medidas a 600 nm, foram diluídas 10.000 vezes e incubadas em uma solução de NaCl 2% com 2 $\mu\text{g/mL}$ de DASPEI por 30 min. Em seguida, 100 μL dessa suspensão foram adicionados a uma placa e observada no microscópio de fluorescência nas mesmas condições das células. Para a microscopia óptica, amostras da cultura foram também diluídas 10.000 vezes e citocentrifugadas em lamínulas nas mesmas condições descritas anteriormente. Estas foram então fixadas em vapor de formol por 45 min e coradas com Tricromo de Mallory (Behmer *et al.*, 1976).

4.0 Resultados

4.1. *Seleção das cepas resistentes e teste de degradação*

No processo de isolamento foram obtidas sete culturas de bactérias resistentes ao TCP nas amostras das três localidades investigadas; São Vicente, São Sebastião e Rio de Janeiro. Destas cepas, quatro foram selecionadas por terem colônias morfológicamente diferentes e três cepas foram excluídas por apresentarem colônias idênticas às de uma das quatro cepas previamente selecionadas. As cepas foram submetidas ao teste de degradação do TCP e seu crescimento foi observado por sete dias, com três disseminações em placas de BHI + ágar feitas nos dias 0, 4 e 7, para a contagem da quantidade de colônias. Ao fim do experimento foi observado um crescimento significativo em apenas uma das cepas. Nesta houve um aumento de 200 colônias comparando a primeira e a última placa ao final do experimento, enquanto as outras não apresentaram nenhum crescimento detectável. Ao separar o sobrenadante da cultura líquida que apresentou crescimento, foi possível verificar uma mudança visível em sua turbidez e coloração. A solução de TCP na concentração utilizada é inicialmente cristalina, e se torna amarelada e turva após o ensaio (Figura 6), indicando a possível metabolização do poluente pelas bactérias.

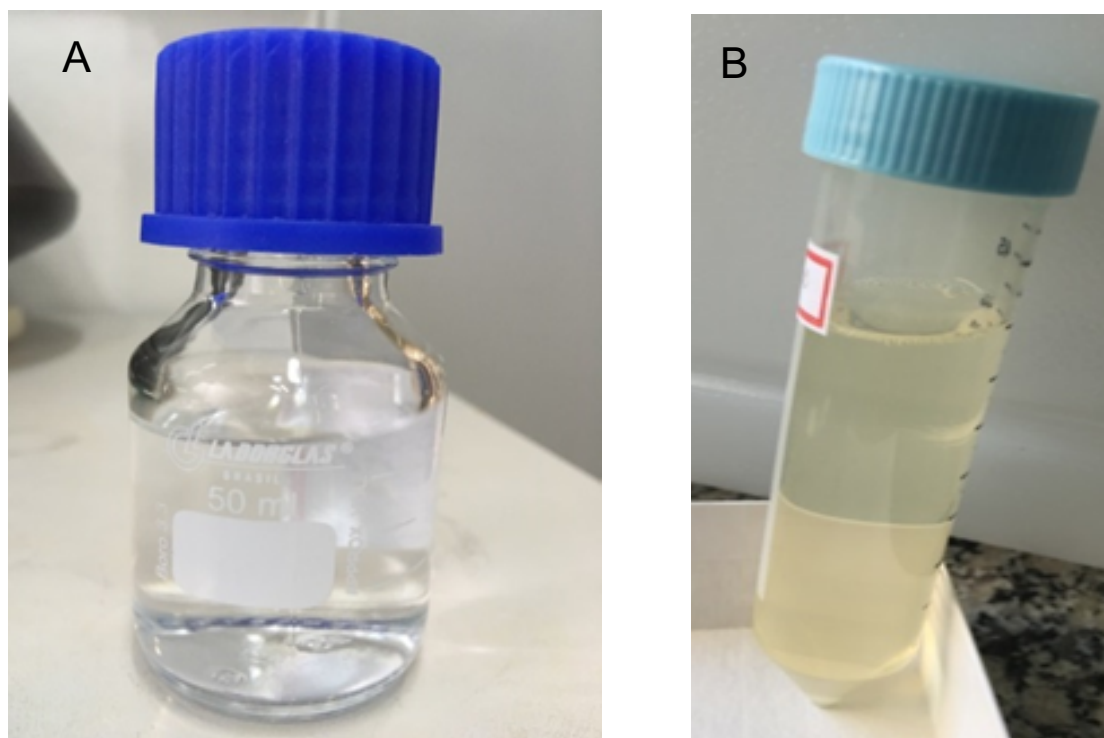


Figura 6 – A) Meio para a cultura com a solução de TCP (100 ppm), mostrando a aparência incolor e translúcida; **B)** Sobrenadante do meio extraído após sete dias de cultura com a bactéria isolada da esponja, apresentando turbidez e a coloração amarelada.

Os sobrenadantes destas culturas foram então submetidos à cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa (GC-MS). Os espectros obtidos geraram a identificação de 474 metabólitos, que foram submetidos a diferentes análises. A primeira foi uma verificação buscando o poluente utilizado, que mostrou não haver mais TCP dentre os metabólitos detectados, indicando sua total degradação durante os ensaios. Em seguida, a lista de metabólitos foi revisada para a eliminação de produtos gerados pelo derivatizante utilizado no GC-MS, o que reduziu o número de compostos para 416 (Tabela S4). Uma segunda análise foi feita então para determinar se algum dos metabólitos poderia ser um dos produtos conhecidos da degradação do TCP, usando o banco de dados do NIST (Wise *et al.*, 2006). Com base nesta comparação, apenas o composto 3,5-Di-*tert*-butylphenol foi identificado como um

possível subproduto da degradação do TCP. Uma pesquisa sobre esse composto foi realizada revelando que ele não apresenta classificação de perigo por toxicidade.

Assim que a lista de metabólitos foi revisada e as primeiras análises foram concluídas, esta foi submetida ao programa MetaboAnalyst onde uma análise vinculou os compostos a vias metabólicas pertencentes ao organismo modelo mais semelhante encontrado na base de dados, *Bacillus subtilis*. Contudo, do total de 416 metabólitos detectados, 273 não eram compatíveis com nenhuma das vias do banco de dados do programa. Para saber mais destes, informações sobre sua composição e toxicidade foram coletadas na base de dados do PubChem. A partir disso, foi verificado que 23 desses compostos apresentavam perigo à saúde humana, ao meio ambiente ou toxicidade aguda (Tabela 2).

Tabela 2 - Toxicidade dos metabólitos do sobrenadante das culturas expostas ao TCP (PubChem)

Compostos	Perigo à saúde	Perigo ao ambiente	Tóxico
Butoxymethyl oxirane	x		
1,12-Dodecane	x		
1,2-Butadiene		x	
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid	x		
1,3-Bis benzene	x		
1,3,5-Cycloheptatriene	x		x
1,4-Dioxane	x		
2-(octadecyloxy)-Ethanol		x	
2-Methyl-1-propane	x		
2,2-Dimethyl-1-propane		x	
2,2,6,6-Tetramethylpiperidine			x
2,3,3-Trimethyl-Pentane	x	x	
3,4-Dimethyl-2-Pentene	x		
3,6,9,12-Tetraazatetradecane-1,14-diamine		x	
6-Methyl-1-Heptanol		x	
Aziridine	x	x	x
Bis(2-ethylhexyl) maleate	x	x	
Cyclooctene	x		
Di-n-octyl phthalate	x		
Dodecyl acrylate		x	
Mercaptoacetic acid			x

A mesma análise a partir dos espectros obtidos por GC-MS foi feita com os sobrenadantes dos controles, sem exposição ao TCP. Foram detectados ao todo 90 metabólitos (Tabela S3), dos quais 47 não se mostraram compatíveis com vias metabólicas disponíveis no MetaboAnalyst. Após a pesquisa no PubChem, apenas

quatro dos compostos verificados apresentaram também perigo ao meio ambiente ou toxicidade aguda (Tabela 3).

Tabela 3 - Toxicidade dos metabólitos do controle		
Compostos	Perigo ao ambiente	Tóxico
2,4-dimethylheptane	x	
Butyl aldoxime		x
Isooctanol	x	
Acenaphthylene		x

Quanto aos compostos compatíveis com vias metabólicas, no tratado havia ao todo 143 metabólitos e no controle 43, esses metabólitos foram conectados com as vias do *Bacillus subtilis*, o modelo mais próximo presente na base de dados do MetaboAnalyst. Na relação de vias metabólicas conectadas aos metabólitos compatíveis, havia 44 para o tratado (Tabela S2) e 30 para o controle (Tabela S1), após uma comparação entre as vias do tratado e controle foram encontradas 26 vias em comum (Figura 7). Contudo, essas vias comuns apresentaram uma mudança na probabilidade de significância e no impacto exercido sobre o organismo. Avaliando o impacto que a via exerce no metabolismo da bactéria, encontramos nove vias com impacto igual a 0,0 no controle e tratado, no entanto, outras 17 vias apresentaram alterações. Algumas das vias das culturas expostas ao TCP demonstraram valores de impacto aumentados (Figura 8), dentre elas estão as vias de biossíntese de aminoacil-tRNA, biossíntese de arginina e metabolismo da cisteína e metionina, também foi identificado o acontecimento inverso em vias como a de metabolismo do amino açúcar e nucleotídeo e metabolismo da taurina e da hipotaurina que apresentavam valores de impacto 0,3 e 0,1 que foram reduzidos a 0,0 no tratado. Quando comparada a probabilidade de significância dessas vias foi observado que todas sofreram alterações, porém em 21 das vias ocorreu o aumento dessa probabilidade no tratado e em outras 5 vias uma diminuição dessa probabilidade foi encontrada em relação ao visto no controle (Figura 9).

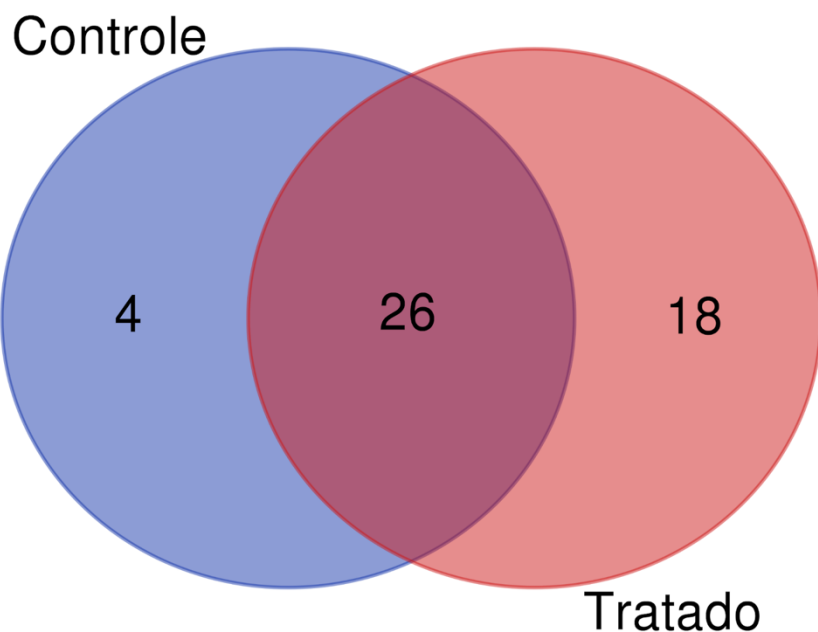


Figura 7 - Diagrama de Venn da relação das vias do controle e tratado. Das vias encontradas quatro são detectadas apenas no controle, 26 vias são comuns a ambos e as bactérias do tratado apresentam 18 novas vias.

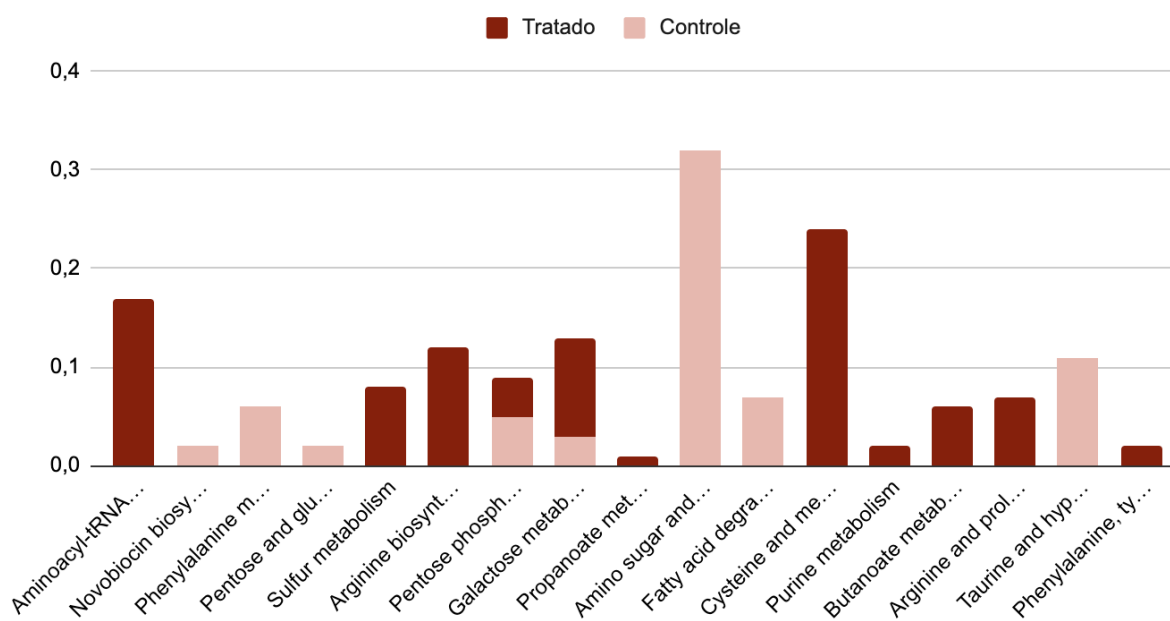


Figura 8 - Variação do impacto das vias metabólicas entre as culturas tratadas (vermelho) e as controle (rosa), mostrando que houve alteração de impacto em todas as vias comuns. Destas, dez tiveram seu impacto aumentado com a exposição ao TCP, enquanto sete foram reduzidas e apresentaram impacto maior no controle.

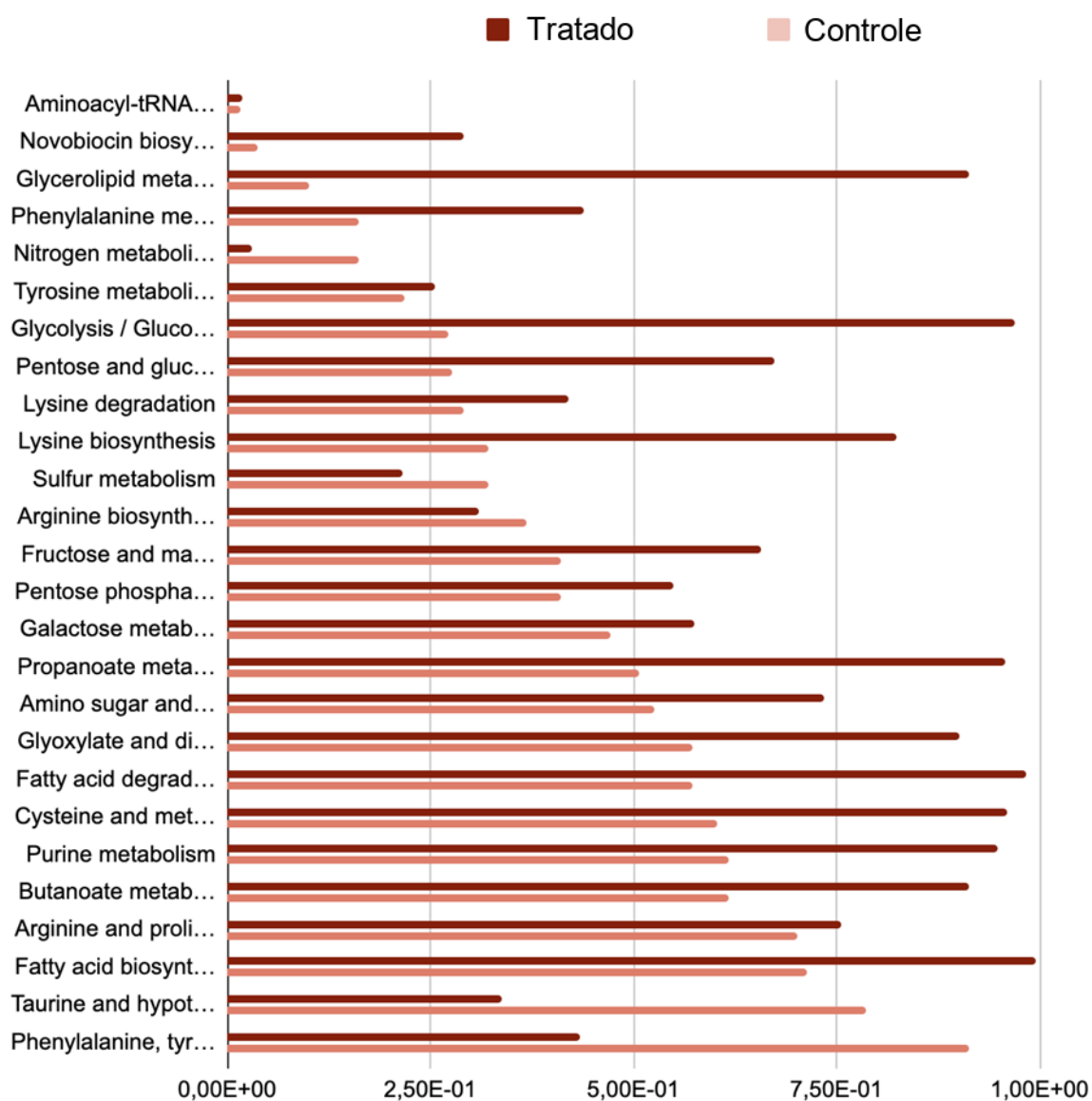


Figura 9 – A comparação dos valores de probabilidade de significância da via (*p bruto*), entre as vias comuns das cepas tratadas (vermelho) e das controle (rosa), revela 21 vias com aumento na significância após a exposição ao TCP e 5 vias com baixa na probabilidade de significância.

4.2. Identificação das cepas resistentes

Espectrometria de massa (BYOTYPER)

O cultivo dos agregados em TCP obtidos a partir da coleta de São Sebastião resultou no isolamento de duas cepas resistentes, identificadas pelo BIOTYPER como

Enterobacter sp. e *Shewanella* sp. (Tabela 4 e Figura 10), com similaridade proteica a nível de gênero, segundo os índices fornecidos pelo programa. Dos agregados obtidos da coleta de São Vicente foram obtidas três cepas, mas só foram obtidas a identificação de duas cepas pelo BIOTYPER, como *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.. E duas cepas foram isoladas das amostras do Rio de Janeiro, porém essas cepas não foram identificadas pelo BIOTYPER por não apresentarem similaridade com o espectro protéico de nenhuma das bactérias relacionadas no banco de dados.

Tabela 4 – Valores do score obtido na identificação com o BIOTYPER

Bactérias	Score
<i>Shewanella</i>	2.275
<i>Enterobacter</i>	2.006

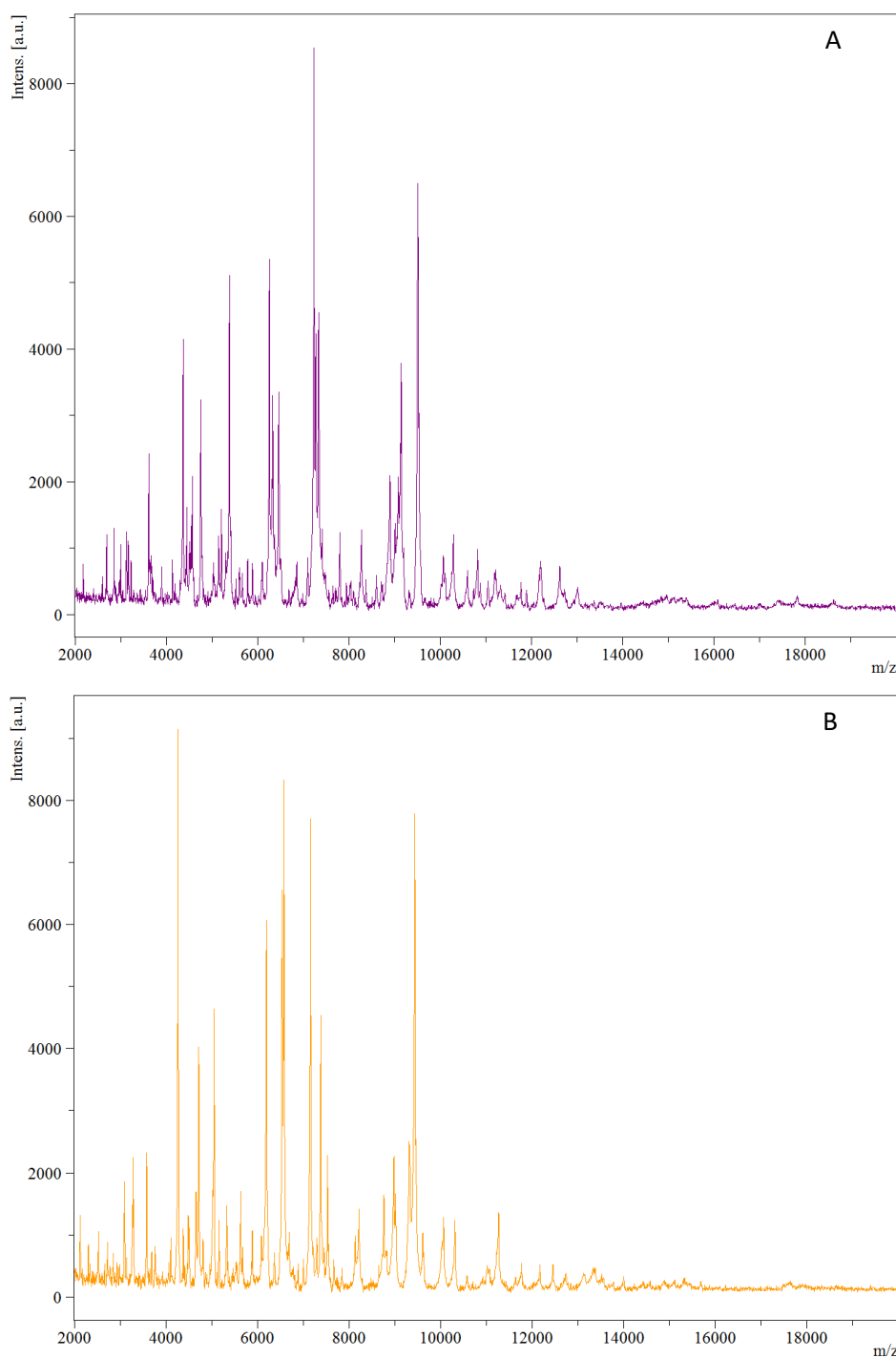


Figura 10 – Espectro protéico das cepas *Enterobacter* sp. (A) e *Shewanella* sp (B), obtidos por espectrometria de massa, mostrando os diferentes perfis utilizados para a identificação no BIOTYPER.

Sequenciamento do 16S rRNA

Das cepas resistentes ao TCP, cinco apresentaram significativa similaridade morfológica (Figura 11) quanto às colônias, mesmo sendo de localidades diferentes

(Tabela 5) e uma destas cepas foi a degradadora de TCP. Foram utilizadas as sequências do gene 16S rRNA (Figura 12 e 13) obtidas para identificar taxonomicamente essas cepas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (filo Firmicutes). Ao confeccionar uma árvore filogenética (Figura 14) com as classificações e os alinhamentos das cepas resistentes, foi observado que todas as cepas se enquadraram no mesmo clado que o *B. velezensis* e o *B. amyloliquefaciens* apresentando um índice de veracidade mínimo de 86 e máxima diferença dos grupos externos.

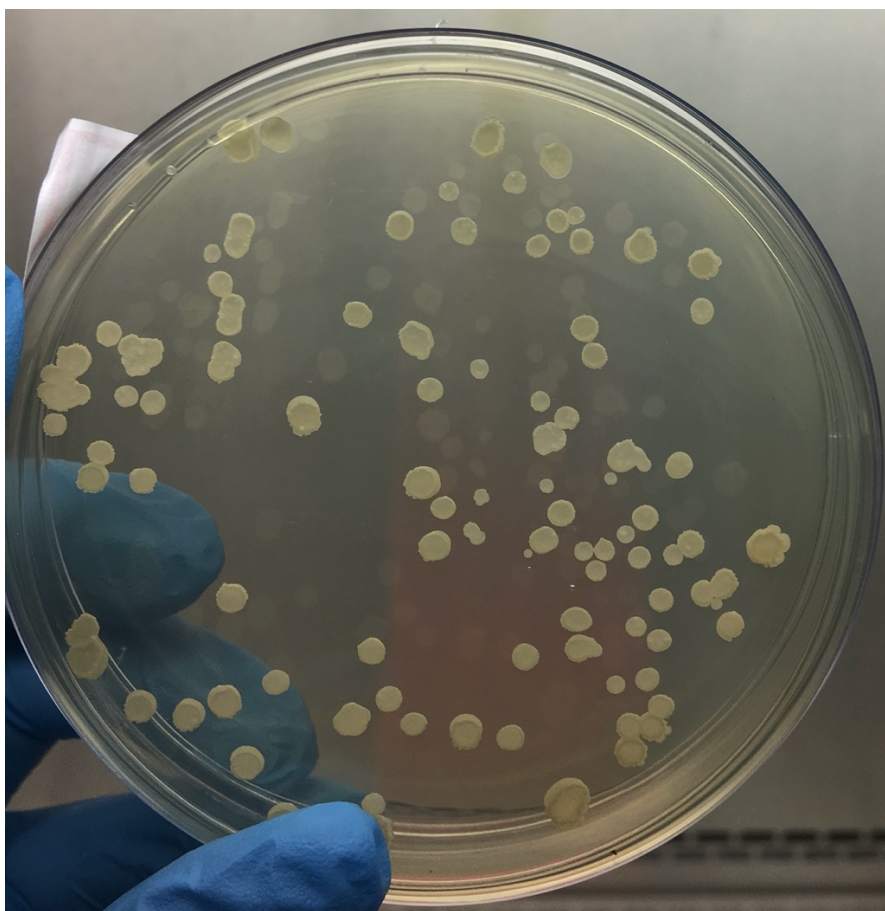


Figura 11 – Placa com a cepa B1. Algumas das características similares entre as cepas B1, B3, B4, B5 e B6 são colônias esbranquiçadas, opacas e com uma protuberância no centro.

Tabela 5 – Relação das cepas sequenciadas com os locais de coleta das amostras

Localidades	Cepas
São Sebastião	B1
São Vicente	B3 e B4
Rio de Janeiro	B5 e B6

>B1_f

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGT
GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCT
GACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAaCCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT
GAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGgCGAACAagGGATTaAATtACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
GTtGCTAAGTGTTAaGGGGGTTTTCCGCCCTTtAAtTGCTGCAGCTAAaCgGCATTAAGCAaCTCCGCCTiGGG
G

>B1_r

CGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTC
ACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTGTTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTT
CGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGATGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGT
CATCCCCACCTTCCCTCCGTTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAG
ATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
CACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGA
GTTTCAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGA
ACCCCTAACACTTACACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACG
CTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTcGCCACTtGTGTCTCCACATCTCTACC
AaTTCACCGCTACACGgTGGAATTCACCTCTCTGCACTCAAGTTCCCCAaGgTTTTCCAaATGACCTC
CCGTTGAGCCGGGGGCTTTCAcCATC

Figura 12 – Sequências *forward* e *reverse* obtidas do gene 16S rRNA da cepa B1, isolada de esponja coletada em São Sebastião – SP, que demonstrou capacidade de degradar TCP.

>B3_f

GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTG
 TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATA
 AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
 GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCT
 TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCACCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
 TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
 ACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGT
 GAaATGCGTAAGATGTGGAGGACACCATGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
 aAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAATACCCTGGTATCCaACGCCGTAAaACGATGA

>B3_r

GCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTG
 TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA
 GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTTCGCTGC
 CCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA
 CCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGT
 TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACT
 CTGCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT
 TGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCG
 ACCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTT
 AGCACTCATCGTTTTACGGCGTGACTACCAAGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGTTTTCGCTCCTCAG
 CGTCAGTTACAGACCAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACaATCTCTACGCATTTACCGCTACA
 aCGTGGATTCCACTCTCTCTtCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGgAGCCGG
 GGGTTTTcACcATCAaaACTAAAAACCGCTG

>B4_f

GCAgTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
 ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGT
 TCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
 ACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
 GCGTGAGTGATGAAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGG
 CGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCAC
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTAC
 GCTGAGGACGAAGCGTGGgGGAGCGAACAGGATTAATACCCTGGTATCCACGCCGTAACATGATGCTAAGT
 GTTAGGGGTTTTCCCCCTTATGCTG

>B4_r

GGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA
 CGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC
 GATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTG
 TAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTC
 ACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA
 CTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGA
 CGTCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA
 CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGC
 GGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTACACTCATCGTTTACGG
 CGTAGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAG
 AGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTcTACGCATTTACCGCTACAcgGTGGAATCCaACTCTCC
 TCTCTGCACTCAgGTTCCCCAGTTTCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAATAAAAaA
 CCGCTG

>B5_f

CAGTCGAGCGGACAGATGGgGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
 CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGT
 CAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
 CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC

GGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
 CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGgGAACTTGAGTGCAAAGAGGAGAgGTGGAATTCCAC
 GTGTACGGTGAATTCGTAGAGATGTGGAGGACACCAGTGGCGAGCACTCTcTGGTCTGTtAACTGACGCT
 GAGaAGCGAAAgCGGTGGGGAgGCCAAACcAGgGATTAATACCTGGTATCCACGCGGTAAaaACAaTgGAG
 TGCTAAGTgTAAgGGGGTTCCGCCCTTATGCTtGCcAGCTAACGCATTAAAGgcCaACTCCGCCTGGgGAG
 gTaACGGtTCGCAaAGACTgGAAAcTCAAAGGATTGgACGGGgGCcCCGCccACAAGcCcGgTgGGAGCATg
 GTGTTTAAATtT

>B5_r

GGCGGCTCATAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
 AAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCCG
 AGTTGCAGACTGCCATCCGAAGTGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTT
 TGTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCTAAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCT
 CCTCCGTTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCTCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCG
 CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGC
 CCCCgAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTcAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
 TCGAATTAaACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCaATTcCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACC
 GTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGC
 ACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTCGCTCCcCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCG
 TCaAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTaACGCATTTCACCGCTACA
 CgGTGATTCACTCTCCtTCTTcCTGCACCTCAAGTTCCCAaGTTTTCAATGACCTCCCCGGGTTGAGCCGGG
 GGGCTTCACATCAACTTAAAAACGCCGCGAGCCCTtTACGCCCAaATAATTCCGAAACGgCTTGCCACCT

>B6_f

CAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
 CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTT
 CAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTCACCAAGGGCAGCATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC
 GGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
 CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGcAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCAG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGgACTCTCTGGTCTGTAACCTGACG
 CTGAGgGAGCgGAAAGCGTtGGGGAGCGAACAGGATTAATACCCTGgGtTAGTCCcCACGCCGTAaAACGATG
 AGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTATG

>B6_r

GGTCTAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG
 CCCGGGAACGTATTACCCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCCGATTTG
 CAGACTGCGATCCGAAGTGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTC
 TGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCTAAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTC
 CGGTTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCTCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCG
 TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCC
 GAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTcAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGA
 ATTAaACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCaATTcCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACT
 CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCA
 TCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTtTACCCGCTACACGTGAA
 TTCCACTCTCCTCTCTGCACTCAGTCCCCAGTTTTCCaATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTTACA
 TCAACTtTAAaAACGCTGCAGCCCTTACGCCCAATAATTCCGAACGCTTGCCCTaAC

Figura 13 – Sequências *forward* e *reverse* do gene 16S rRNA das cepas com colônias similares a B1 e isoladas de esponjas coletadas no Rio de Janeiro e Santos.

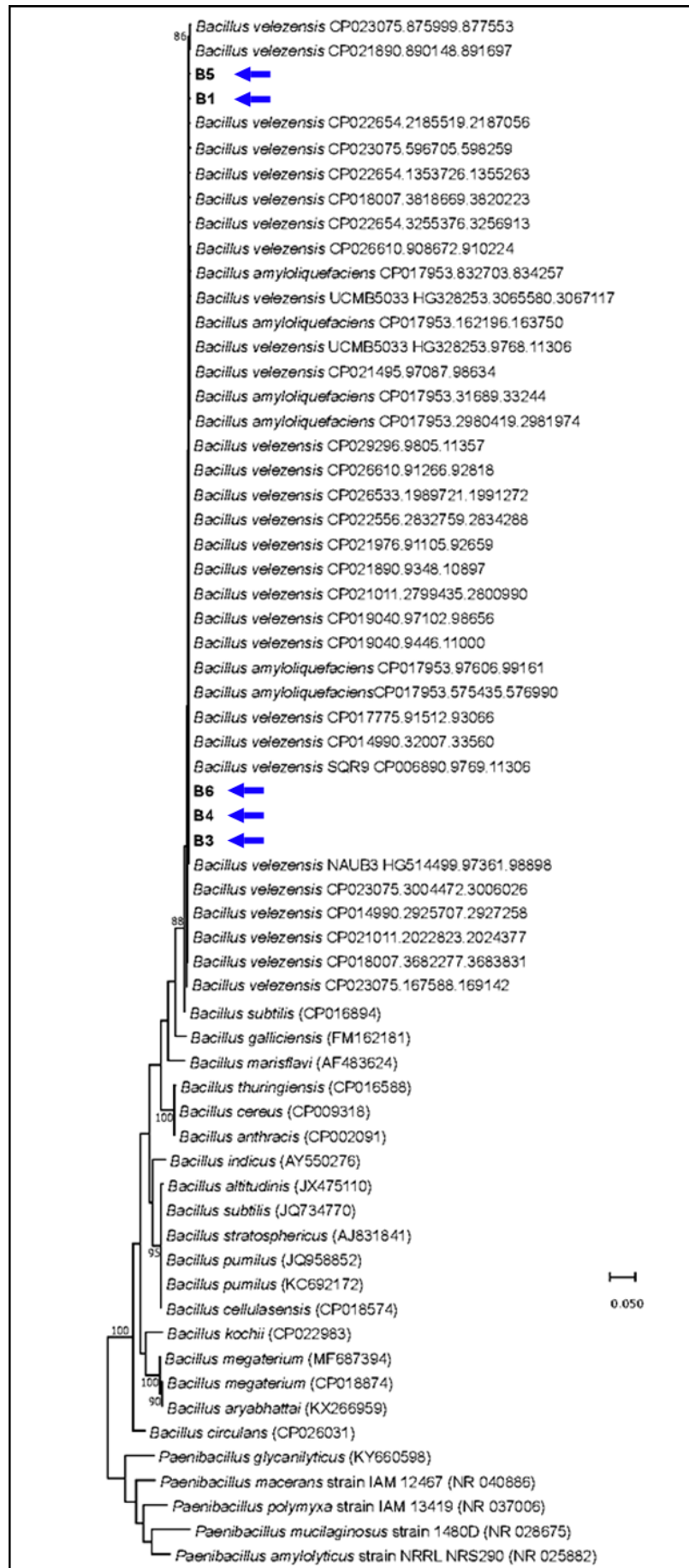


Figura 14 (página anterior) - Árvore filogenética das cepas com morfologia similar mostrando que todas as cepas isoladas (setas) estão enquadradas dentro de um mesmo clado com a *Bacillus velezensis*.

4.3. Localização das bactérias nas células das esponjas

Nos citocentrifugados corados por Tricromo de Mallory foram observados dois tipos diferentes de células semelhantes aos bacteriócitos descritos anteriormente para *H. heliophilla* (Figura 15. Custódio *et al.*, 2004). Ambas apresentam um núcleo pequeno e um citoplasma contendo inclusões em número variado com afinidade à fucsina ácida do Tricromo, porém com morfologias diferentes. Na primeira das células estas inclusões eram filamentosas enquanto na segunda eram pequenas e definidas, em formato de bastonetes semelhante aos *Bacillus* obtidos nas culturas com o TCP. Nas lâminas coradas apenas com Fucsina Ácida ou Azul de Toluidina não foi possível identificar os bacteriócitos, pela pouca diferenciação de cor entre as várias inclusões nas diversas células. A marcação fluorescente com DASPEI revelou a maioria dos diferentes tipos celulares com coloração espalhada no seu citoplasma, às vezes com mais concentração em vesículas definidas (Figura 16). Nestas, o núcleo é facilmente percebido como uma área mais central escura, sem marcação. No entanto, alguns tipos celulares na suspensão mostravam o citoplasma inteiramente marcado fortemente, e o núcleo não pode ser definido (Figura 16). Observando as bactérias degradadoras de TCP, de forma isolada em citocentrifugados corados com Tricromo ou em suspensão com o DASPEI, foi possível observar que são móveis e que apresentam o formato de bacilos, bastante similar ao observado nos possíveis bacteriócitos.

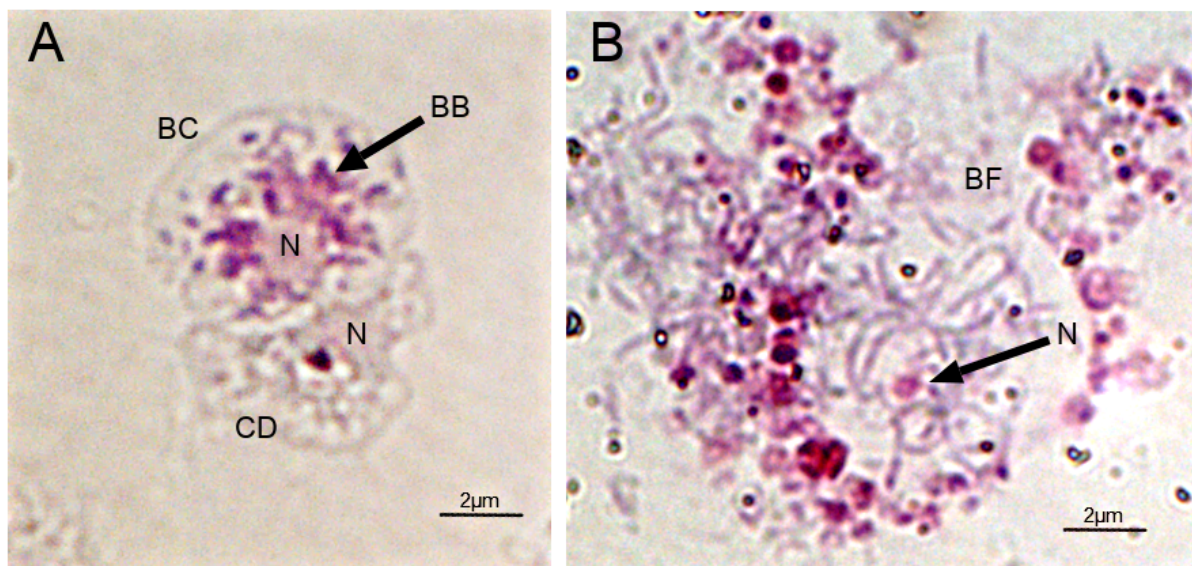


Figura 15 – Dois tipos de bacteriócitos encontrados nos citocentrifugados de *Hymeniacidon heliophila* (Tricromo de Mallory). **A** - duas células sendo uma não identificada (CD) e a outra é um bacteriócito (BC) com o citoplasma repleto bactérias com aspecto de bacilos (BB) ao redor do núcleo (N) (A); **B** – bacteriócito com bactérias filamentosas (BF) ao redor do núcleo (N).

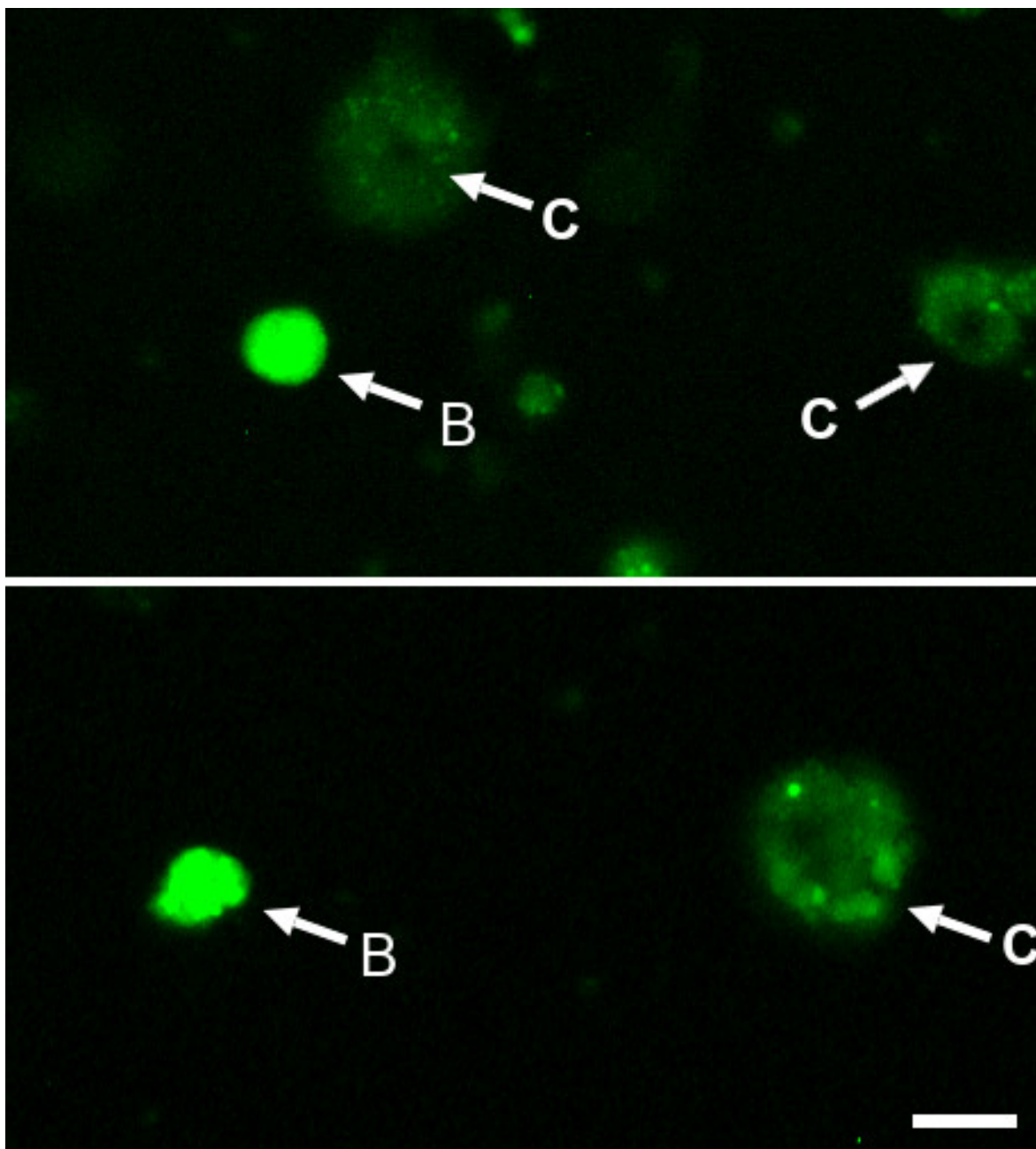


Figura 16 – Duas imagens de células em suspensão coradas com DASPEI. A maioria das células (C) mostra o citoplasma com coloração difusa ou concentrada em poucas vesículas, com o núcleo mais escuro sem marcação. Os bacteriócitos (B) têm o citoplasma fortemente corado, não sendo possível identificar a região do núcleo (barra de escala 10 μm).

5.0 Discussão

5.1. Seleção e teste de degradação

O teste de degradação identificou uma cepa com potencial para degradar completamente o TCP, identificada posteriormente como *Bacillus velezensis*. Este gênero é comum, e conhecido por suas capacidades para metabolizar compostos difíceis. Estudos anteriores com diferentes espécies do gênero *Bacillus* mostram sua capacidade de reduzir hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs, Lu *et al.*, 2019). Foi visto também que esta capacidade aumenta ao longo do tempo de interação e é acompanhada pelo crescimento progressivo das células da bactéria (Elenga-Wilson *et al.*, 2021; Nedoroda *et al.*, 2021). Ou seja, estas bactérias são adaptáveis e não apenas podem degradar os compostos, mas também utilizam como fonte de energia. A descoberta do *B. velezensis* que degrada TCP foi confirmada através da metabolômica, uma técnica que facilita as comparações de compostos de esponja produzidos dentro e entre táxons (Paul *et al.*, 2019). Essas análises revelaram que a cepa isolada foi capaz de metabolizar todo o TCP do meio em apenas sete dias, o que mostra seu bom potencial no tratamento desse resíduo.

Mesmo tendo demonstrado um alto índice de remoção, a metabolização da substância ainda apresentava risco de gerar subprodutos com níveis tóxicos superiores ao próprio TCP. O sobrenadante das culturas foi então analisado e após uma verificação minuciosa, um único subproduto foi identificado, o 3,5-Di-tert-butylphenol (3,5-DTBP, Figura 17). Esse composto não apresenta classificações de perigo definidas nos bancos de dados utilizados, mas alguns estudos já investigam sua utilização como um fármaco de ação antibiótica. O potencial do 3,5-DTBP como inibidor da formação de biofilmes bacterianos foi descrito em um ensaio contra *Streptococcus mutans*, uma bactéria causadora de cáries, em que ele inibiu a formação de biofilme, além de reduzir significativamente a propriedade de adesão, acidogênese e aciduricidade por meio do comprometimento das produções enzimáticas e regulação negativa dos genes de virulência *gtf* e *vicR/K* (Vijayakumar e MuhlVannan, 2021). Outro estudo também explora a capacidade antibiofilme e antifúngica do composto, mostrando que o 3,5-DTB consegue interromper a formação e romper biofilmes maduros, tornando-o um potencial novo agente para tratar infecções associadas a espécies de *Candida* (Rathna *et al.*, 2016). Esses estudos

favorecem a hipótese de que este composto possa ser utilizado pelo *B. velezensis* associado à esponja para evitar competição com outras bactérias ou mesmo auxiliar o hospedeiro na proteção contra microrganismos patogênicos. Em termos de biorremediação do TCP, mostram que a metabolização do composto pelo *B. velezensis* gerou ainda um subproduto útil, que pode ser empregado como princípio ativo de novos fármacos.

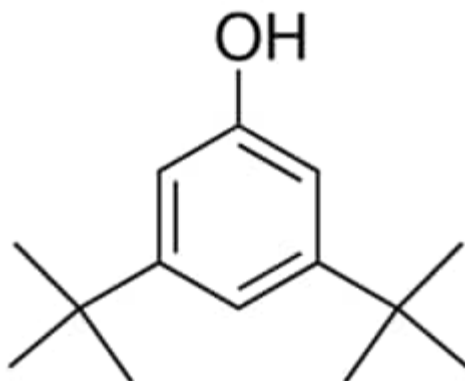


Figura 17 – Estrutura em 2D da molécula de 3,5-Di-tert-butylphenol, subproduto proveniente da degradação de TCP pela bactéria associada (imagem: Sigma-Aldrich).

Junto ao subproduto da degradação encontramos outros compostos e parte deles parece se envolver ativamente em vias metabólicas comuns ao modelo mais próximo presente no banco de dados utilizado, o *B. subtilis*. Um alinhamento entre as vias do controle e tratado revelou vias em comum, que provavelmente pertencem ao metabolismo tradicional do *B. velezensis*. Porém, as análises estatísticas baseadas no valor de p bruto que o MetaboAnalyst executa mostraram uma discrepância entre os valores de impacto e de probabilidade de significância dessas vias. Essas diferenças indicam que o metabolismo basal é impactado, ocorrendo ajustes para que a bactéria consiga metabolizar o TCP. No entanto, não encontramos nenhum indício de prejuízo ao crescimento da bactéria, sugerindo que essas adaptações podem ser usuais para o microrganismo. Isto pode indicar que a cepa associada possui os componentes moleculares necessários, que são ativados para permitir a eventual degradação de poluentes que as esponjas hospedeiras absorvem continuamente.

Um dado que corrobora a associação da cepa com a esponja é a presença da via de metabolismo do nitrogênio como via comum da bactéria. Entre os membros

dominantes do microbioma de *H. heliophila* existem linhagens que apresentam taxas significativas de ciclagem de nitrogênio (Weigel e Erwin, 2017) e que têm o potencial de contribuir para uma gama diversificada de transformações de nitrogênio no holobionte. Essa associação pode ser característica em algumas espécies de áreas mais impactadas. As células das esponjas obtêm o nitrogênio a partir do particulado orgânico retido na filtração e excretam amônia como produto metabólico final (Bell, 2008; Zhang *et al.*, 2019. Figura 18). A associação com microrganismos oxidantes de amônia pode ser importante na detoxificação das células da esponja. Isso aumenta a aptidão dos hospedeiros para habitar áreas poluídas ao redor de grandes cidades, como os locais amostrados neste trabalho, que muitas vezes possuem concentrações mais altas de amônia (Turque *et al.*, 2010).

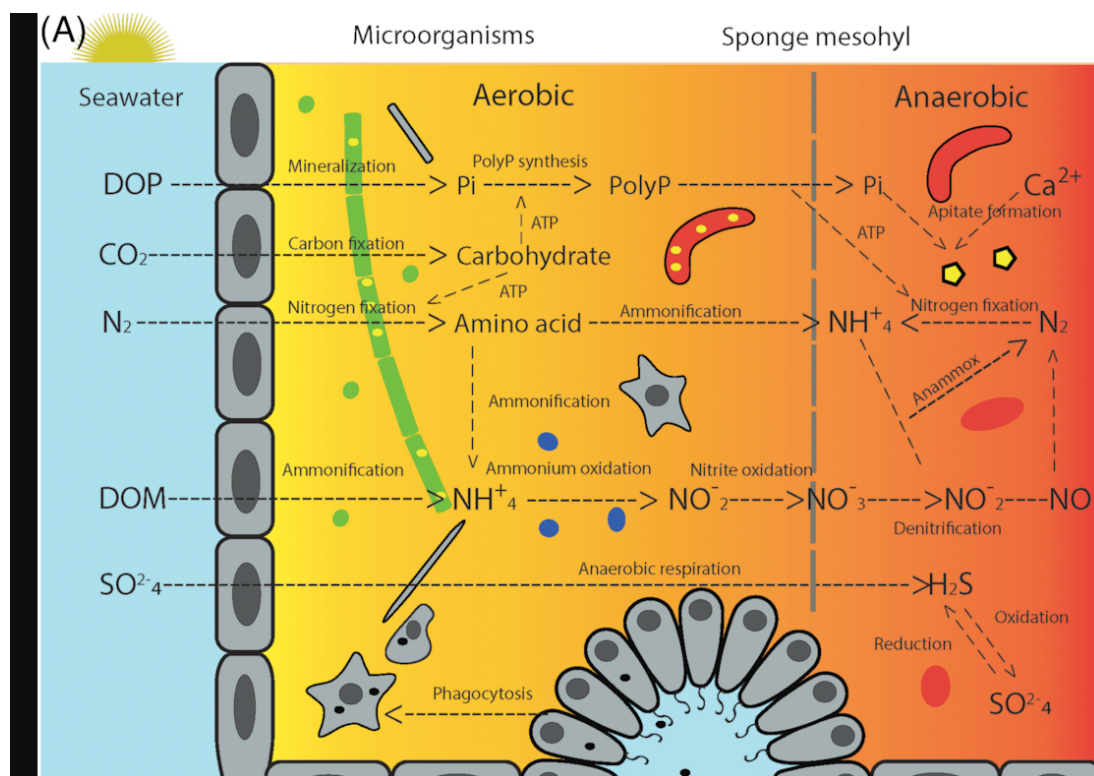


Figura 18 – Interação dos microrganismos associados à esponja presentes no mesohilo. O metabolismo de nitrogênio dos simbiontes é ligado com a reciclagem de amônia secretada pelas esponjas e as interações envolvendo o metabolismo do enxofre e do carbono. Todas estas vias foram encontradas na análise do metabolismo da bactéria degradadora de TCP (imagem: Zhang *et al.* 2019).

Durante a vinculação dos compostos com as vias metabólicas também identificamos alguns que não apresentaram nenhuma correspondência. Uma explicação para esses compostos não encontrados nos bancos de dados pode ser a

sua participação apenas em vias específicas da espécie associada à esponja, *B. velezensis*. Desta forma, não constam na relação dos componentes das vias metabólicas do modelo *B. subtilis* utilizado na análise. Apesar de serem necessárias análises mais específicas para elucidar as dúvidas sobre esses compostos, uma verificação minuciosa foi realizada para identificar se algum deles possuía classificação de perigo, sendo encontrados ao todo 23 no tratado e 4 no controle. Esses compostos também podem estar relacionados com o metabolismo do hospedeiro, podendo ser utilizados como um mecanismo de defesa contra predação ou microrganismos patogênicos.

5.2. Identificação das cepas resistentes ao TCP

A identificação de bactérias por meio de espectrometria de massa tem sido amplamente utilizada, por apresentar um custo significativamente mais baixo e tempo de resposta bem menor do que a técnica tradicional de sequenciamento do gene 16S rDNA. Esse método baseia-se na ionização da amostra que resulta em um espectro predominantemente constituído por proteínas ribossomais citosólicas (Arnold e Reilly 1999; Teramoto *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2011) e na comparação desse perfil com um banco de dados de espectros de referência (Winefordner, 2006). Os espectros alocados nos bancos de dados são resultado de uma série de experimentos padronizados para a obtenção dos perfis moleculares. Sendo repetidos várias vezes para cada linhagem bacteriana (Mellmann *et al.*, 2008; Freiwald *et al.*, 2009), esta análise gera então um espectro padrão, contendo as características de massa mais significativas para cada espécie. Entretanto, no presente esses bancos de dados ainda são em sua maioria orientados para o diagnóstico clínico rápido, e contêm espécies e cepas predominantemente patogênicas (Starostin *et al.*, 2015). Para que uma identificação seja confirmada precisa haver um score mínimo de 1.700, valor relacionado ao grau de compatibilidade entre os perfis protéicos e obtivemos score superior a 2.000 nas identificações realizadas. No presente trabalho, foi utilizado o banco de dados do próprio fabricante do equipamento (Bruker Daltonics), que contém a maior e mais elaborada base de dados de microrganismos, com mais de 6.000 linhagens, sendo a maior parte de bactérias.

A maioria dos estudos que comparam a identificação por espectrometria de massa com o sequenciamento do gene 16S rDNA mostra que os resultados obtidos

são extremamente confiáveis sendo quase sempre idênticos. Porém, em nossos experimentos obtivemos resultados com discrepância entre a identificação das duas técnicas. Acreditamos que esse erro ocorreu por uma limitação no banco de dados, pois apenas um número relativamente baixo de espécies bacterianas marinhas está associado a infecções humanas, com os membros mais notáveis pertencentes ao gênero *Vibrio* (Janda, 2014). Procurando por registros de limitações dos bancos de dados foram localizados alguns estudos sugerindo um déficit na identificação de bactérias raras e anaeróbias (La Scola *et al.*, 2011; Culebras *et al.*, 2012; Veloo *et al.*, 2016). Em relação às bactérias anaeróbias, a conclusão é de que os bancos de dados dos sistemas MALDI-TOF MS realmente necessitam de uma otimização para que esses microrganismos sejam mais corretamente identificados (La Scola *et al.*, 2011; Culebras *et al.*, 2012; Veloo *et al.*, 2016). Outra complicação nessa técnica é a base dos espectros ser composta principalmente de proteínas ribossomais (Murray, 2012), o que limita a identificação de gêneros com espécies que não podem ser diferenciadas através do sequenciamento do gene 16S rDNA, como o gênero *Veillonella* (Veloo *et al.*, 2018). Dadas estas limitações, a identificação mais confiável obtida para a cepa associada à *H. heliophila* ainda é a fornecida pelo método tradicional de sequenciamento do 16S rDNA: *B. velezensis*.

Como observado na árvore filogenética (Figura 14), todas as cepas isoladas de *H. heliophila* que apresentaram uma morfologia semelhante estão incluídas no mesmo cluster do *B. velezensis*. Além de se destacar por sintetizar várias biomoléculas de interesse biotecnológico, essa bactéria aparece na literatura em associação com plantas (Rabbee *et al.*, 2019), macroalgas (Chakraborty *et al.*, 2021) e de pelo menos uma esponja marinha (*Biemna fortis*, Sawhney *et al.*, 2018). A esponja *H. heliophila* tem uma ampla distribuição, do Brasil aos Estados Unidos e sabe-se que apresenta estabilidade das OTUs de simbiontes dominantes em uma ampla faixa geográfica (Weigel e Erwin, 2016). Esta característica e o fato de que a *B. velezensis* foi isolada a partir de esponjas de três localidades diferentes, reforçam a idéia de que esta cepa é realmente associada a *H. heliophila*. Complementar às análises feitas neste trabalho, uma análise comparativa do genoma do simbionte *B. velezensis* e da esponja hospedeira *H. heliophila* permitiria avaliar com maior profundidade aspectos ainda desconhecidos dessa associação, como a existência de interação genética entre esses simbiontes.

5.3. Localização da bactéria no meio intracelular das esponjas

Para que pudéssemos localizar a bactéria degradadora de TCP em cortes da esponja ou meio intracelular, em bacteriócitos, a técnica mais apropriada seria a hibridização *in situ* (FISH), nessa técnica uma sonda específica contendo um marcador fluorescente é produzida a partir da sequência do gene 16S rDNA da cepa de interesse. Cortes histológicos ou células isoladas são então incubadas com esta sonda e após o tempo de reação ocorre anelamento exclusivamente com a sequência complementar. Desta forma, as bactérias de interesse seriam marcadas de forma fluorescente permitindo visualizar sua localização. A utilização desta técnica foi considerada no presente trabalho devido a cepa ter sido identificada inicialmente como pertencente ao gênero *Shewanella*. Apesar desse gênero estar amplamente associado ao ambiente marinho apenas algumas espécies, como a *Shewanella algae* (Rachanamol *et al.*, 2014) e *Shewanella irciniae* (Rua *et al.*, 2014), já foram descritas como associadas a esponjas marinhas. Considerando que na esponja *H. heliophilla* também encontraríamos poucas espécies de *Shewanella*, nossa cepa seria um bom modelo para o FISH. Contudo, a sequência do gene 16S rDNA obtida identificou nossa cepa como *B. velezensis* (filo Firmicutes), com um alto grau de similaridade. Curiosamente, estudos anteriores feitos com *H. heliophilla* (Turque *et al.*, 2008; Weigel e Erwin, 2016), mostram Firmicutes, mas não destacam especificamente *Bacillus*. Isso pode ser devido a diferenças metodológicas e de abordagem, mas talvez indique também ao fato da cepa isolada no presente trabalho ser um componente minoritário, não detectável em uma esponja em condições normais.

Com a identificação como *Bacillus*, surgiram problemas quanto à utilização da técnica FISH. Microrganismos deste grupo são uma das cepas de bactérias mais comuns no mundo, e freqüentemente descritas em associação com Porifera (Pabel *et al.*, 2003; Santos-Gandelman *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram que este grupo pode representar cerca de 20% da microbiota total de algumas esponjas (Brück *et al.*, 2010) e quase metade das cepas cultiváveis (Zuppa *et al.*, 2014; Dat *et al.*, 2021). Conforme mostrado anteriormente na figura 15, espécies de *Bacillus* têm um alto grau de similaridade nas suas sequências do gene 16S rDNA. Esse fato, juntamente com uma população contendo muitas dessas espécies poderia resultar em falsos positivos na localização da cepa de interesse com a técnica de hibridização. Uma solução possível seria obter a identificação de todas as bactérias do gênero *Bacillus* que são

associadas à esponja e comparar suas sequências para selecionar uma região com maior especificidade, porém isso seria inviável pelo custo e tempo necessário.

Para ter alguma informação a respeito da localização geral das bactérias associadas à esponja e da cepa isolada, foram usadas então apenas técnicas de microscopia ótica. A primeira delas utilizou Tricromo de Mallory, técnica que emprega uma sequência de colorações por fucsina ácida, alaranjado G e azul de metila. Com isto os componentes celulares são mais bem destacados permitindo uma clara observação das estruturas e da natureza de inclusões no citoplasma. Com essa técnica conseguimos observar os dois tipos de bacteriócitos descritos por Custódio *et al.* (2004). Numa observação apenas superficial, comparando com bactérias das nossas culturas, é possível que o *B. velezensis* sejam as contidas no “Type XIII”, já que o segundo tipo (“XI”) apresenta bactérias claramente bem filamentosas.

Uma segunda técnica mais específica tentada foi o DASPEI, um marcador fluorescente para mitocôndrias (Padeniya *et al.*, 2022), mas que também pode ser utilizado para bactérias (Murakami *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2015). Todas as células normalmente aparecem com a marcação no citoplasma, por vezes localizada ao redor do núcleo, com maior ou menor grau dependendo da atividade metabólica e da quantidade de mitocôndrias. Analisando as suspensões celulares de *H. heliophila* percebemos a presença dessa marcação fluorescente na grande maioria das células. Porém algumas poucas tinham o citoplasma totalmente fluorescente e com aspecto granuloso, indicando que podem ser os bacteriócitos. Sendo uma suspensão, não foi possível distinguir se as marcações no interior dessas células completamente marcadas eram bactérias e qual o formato.

Assim não obtivemos dados suficientes para confirmar essa identificação nos bacteriócitos e eliminar a possibilidade da cepa que degrada TCP estar presente em outro local na matriz da esponja. No entanto, essa seria uma possibilidade interessante. Bacteriócitos são pouco estudados e em geral raros, representando em *H. heliophila* menos de 1% da população celular da esponja (Custódio *et al.*, 2004). Estas células são altamente especializadas a manter bactérias em seu citoplasma, controlando as interações com o hospedeiro e a liberação de metabólitos provenientes desses simbioses. Dada o longo tempo evolutivo que esta relação pode ter, as cepas no interior das células podem ser únicas e produzir compostos ou ter mecanismos enzimáticos de valor aplicado. Um exemplo dessa relação já foi descrito para uma esponja do gênero *Haliclona* (Figura 18. Tianero *et al.*, 2019). Nessa

esponja, os bacteriócitos contêm uma nova cepa, *Candidatus* “Endohaliclona renieramycinifaciens”, que tem um genoma extremamente reduzido e é responsável pela produção de renieramicina, um composto com potentes atividades antibióticas e citotóxicas. Tendo em vista isto, os autores propõem o novo termo “quimiobacteriócitos” para descrever estas células (Tianero *et al.*, 2019).

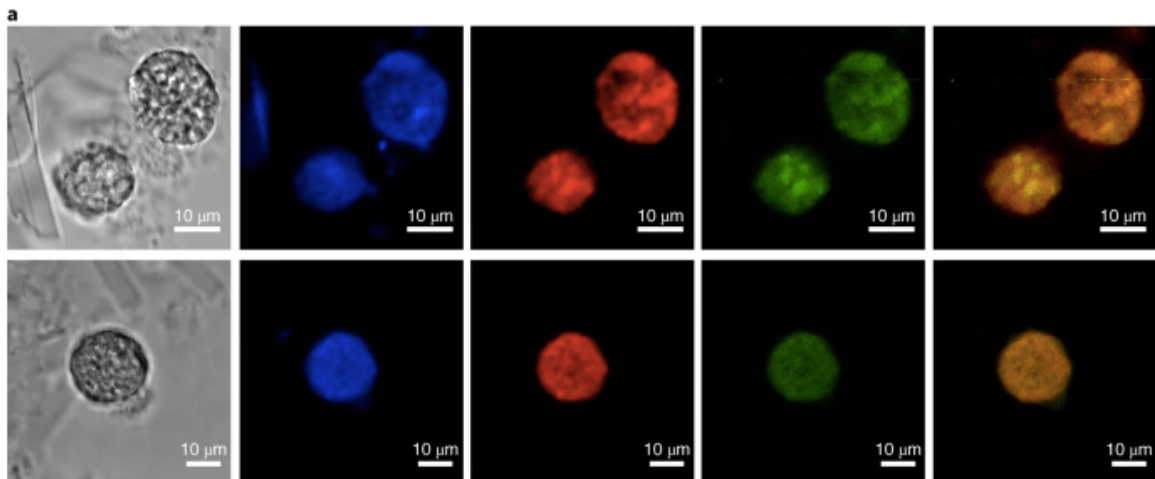


Figura 19 – Resultados do FISH em quimiobacteriócitos de *Haliclona* sp. (Tianero *et al.*, 2019). Se comparada com a coloração com DASPEI utilizada por nós vemos resultados muito similares. Da esquerda para a direita: imagem de campo claro; Coloração DAPI (azul); hibridização com as sondas eubacterianas universais EU338 I, II e III (vermelho); hibridização com *Ca. E. renieramycinifaciens* utilizando a sonda CE75 específica para esta bactéria (verde); Composição dos sinais verde e vermelho, mostrando sua co-localização (amarelo).

6.0 Conclusões

A bactéria *Bacillus velezensis* isolada a partir da esponja *Hymeniacidon heliophila* se mostrou muito eficaz na degradação do 2,4,6-triclorofenol. Isto a torna um microrganismo de interesse biotecnológico, pois poderia ser empregado no tratamento de contaminação por TCP. Porém, ainda são necessários estudos adicionais para elucidar melhor o metabolismo do TCP e seus subprodutos. Ainda assim, a hipótese dessa bactéria estar associada com a esponja se torna mais sólida, com a descoberta de vias metabólicas que parecem estar vinculadas às da esponja, como a reciclagem de subprodutos do metabolismo da hospedeira. Essas características, juntamente com o potencial de degradação de poluente verificado através de nossos experimentos, tornam essa bactéria um simbiote de alto interesse. Além disso, essa cepa foi encontrada em associação com esponjas de três localidades diferentes e distantes, todas as três com altos índices de poluição: São Vicente (PS), São Sebastião (SP) e Rio de Janeiro (RJ). Isso sugere que essa simbiose é recorrente dentro da espécie *Hymeniacidon heliophila*, além de indicar também que esse simbiote pode ter um papel importante na resistência à poluição, permitindo que essa esponja ocupe áreas sujeitas a impactos antrópicos. Seria interessante investigar mais profundamente as interações que esta cepa desempenha no hospedeiro, mas a associação de simbiose entre esponjas e suas microbiotas é extremamente complexa. Para poder ter uma visão mais profunda dessa relação entre a esponja *Hymeniacidon heliophila* e *Bacillus velezensis* são necessárias análises mais extensivas dos seus genomas a partir de técnicas moleculares para compreender melhor as interações fisiológicas e evolutivas entre esses dois organismos.

7.0 Referencias bibliográficas

- Abdel-Monem, NM, Abdel-Azeem, AM, El-Ashry, ESH, Ghareeb, DA, Nabil-Adam, A (2013) Pretreatment hepatoprotective effect of the marine fungus derived from sponge on hepatic toxicity induced by heavy metals in rats. *Biomed. Res. Int.*, 1–15.
- Agency For Toxic Substances And Disease Registry (ATSDR) (2017) Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act (CERCLA) priority list of hazardous substances. Available in: <https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/>
- Altschul, SF, Madden, TL, Schäffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W, Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389-3402.
- Araújo, KSD, Antonelli, R, Gaydeczka, B, Granato, AC, Malpass, GRP (2016) Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 11(2):387-401.
- Arnold RJ and Reilly, JP (1999) Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 269(1):105-112.
- Ashelford, KE, Chuzhanova, NA, Fry, JC, Jones, AJ, Weightman, AJ (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied And Environmental Microbiology*, 71:7724–7736.
- Azam, F and Malfatti, F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5:782–791.
- Bala, S, Garg, D, Thirumalesh, BV, Sharma, M, Sridhar, K, Inbaraj, BS, Tripathi, M (2022). Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. *Toxics*, 10(8):484-508.
- Baquiran, JIP, Nada, MAL, Posadas, N, Manogan, DP, Cabaitan, PC, Conaco, C (2020) Population structure and microbial community diversity of two common tetillid sponges in a tropical reef lagoon. *Peer J.*, 4:1-25.

- Batista, D, Muricy, G, Rocha, RC, Miekeley, NF (2014) Marine sponges with contrasting life histories can be complementary biomonitors of heavy metal pollution in coastal ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.*, 21:5785-5794.
- Behmer, O, Tolosa, E, Freitas-Neto, A (1976) Manual de técnicas de histologia normal e patológica. EDART / EDUSP, p. 122.
- Bell, JJ (2008) The functional roles of marine sponges. *Est. Coast Shelf Sci.*, 79:341–353.
- Benitez, FJ, Beltran-Heredia, J, Acero, JL, Rubio, FJ (2001) Oxidation of several chlorophenolic derivatives by UV irradiation and hydroxyl radicals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3):312– 320.
- Bibi, F, Faheem, M, Azhar, EI, Yasir, M, Alvi, SA, Kamal, MA, Ullah, I, Naseer, MI (2017) Bacteria from marine sponges: a source of new drugs. *Curr. Drug Metab.*, 18:11–15.
- Blunt, JW, Copp, BR, Keyzers, RA, Munro, MH, Prinsep, MR (2012) Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29(2):144-222.
- Borges, AC, Sanders, CJ, Santos, HLR, Araripe, DR, Machado, W, Patchineelam, SR (2009) Eutrophication history of Guanabara Bay (SE Brazil) recorded by phosphorus flux to sediments from a degraded mangrove area. *Mar. Pollut. Bull.*, 58:1739-1765.
- Breves-Ramos, A, Lavrado, HP, Junqueira, ADOR, Silva, SHGD (2005) Succession in rocky intertidal benthic communities in areas with different pollution levels at Guanabara Bay (RJ-Brazil). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 48(6):951-965.
- Brück, WM, Brück, TB, Self, WT, Reed, JK, Nitecki, SS, McCarthy, PJ (2010) Comparison of the anaerobic microbiota of deep-water *Geodia* spp. and sandy sediments in the Straits of Florida. *The ISME Journal*, 4(5):686-699.
- Burgsdorf, I, Slaby, BM, Handley, KM, Haber, M, Blom, J, Marshall, CW, Gilbert, JA, Hentschel, U, Steindler, L (2015) Lifestyle evolution in cyanobacterial symbionts of sponges. *MBio*, 6(3)e0039:1-15.
- Caldart, ET, Mata, H, Canal, CW, Ravazzolo, AP (2016) Phylogenetic analysis: basic concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. *Acta Scientiae Veterinariae*. 44(1):20.
- Caliman, A, Carneiro, LS, Leal, JJ, Farjalla, VF, Bozelli, RL, Esteves, FA (2012) Community biomass and bottom up multivariate nutrient complementarity

- mediate the effects of bioturbator diversity on pelagic production. *PLoS One*, 7(9)e44925.
- Carballo, JL, Naranjo, SA, Garcia-Gómez, JC (1996) Use of marine sponges as stress indicators in marine ecosystems at Algeciras Bay (Southern Iberian Peninsula). *Marine Ecology Progress Series*, 135:109–122.
- Carrier, TJ, Maldonado, M, Schmittmann, L, Pita, L, Bosch, TC, Hentschel, U (2022) Symbiont transmission in marine sponges: reproduction, development, and metamorphosis. *BMC Biology*, 20(1):1-19.
- Carroll, AR, Copp, BR, Davis, RA, Keyzers, RA, Prinsep, MR (2021) Marine natural products. *Natural Product Reports*, 38(2):362-413.
- Cebrian, E, Martí, R, Uriz, JM, Turon, X (2003) Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: Metal accumulation and biological responses. *Marine Pollution Bulletin*, 46:1273–1284.
- Cebrian, E, Agell, G, Martí, R, Uriz, MJ (2006) Response of the Mediterranean sponge *Chondrosia reniformis* Nardo to heavy metal pollution, *Environmental Pollution*, 141:452–458.
- Celis-Hernández, O, Ávila, E, Ward, RD, Rodríguez-Santiago, MA, Aguirre-Téllez, JA (2021) Microplastic distribution in urban vs pristine mangroves: Using marine sponges as bioindicators of environmental pollution. *Environmental Pollution*, 284:117391.
- Chakraborty, K, Francis, A, Chakraborty, RD, Asharaf, S, Kizhakkekalam, VK, Paulose, SK (2021) Marine macroalga-associated heterotrophic *Bacillus velezensis*: a novel antimicrobial agent with siderophore mode of action against drug-resistant nosocomial pathogens. *Archives of Microbiology*, 203(9):5561-5575.
- Cheng, C, MacIntyre, L, Abdelmohsen, UR, Horn, H, Polymenakou, PN, Edrada-Ebel, R, Hentschel, U (2015) Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges. *PLoS One*, 10:1-21.
- Cheng, MM, Tang, XL, Sun, YT, Song, DY, Cheng, YJ, Liu, H, Li, PL, Li, GQ (2020) Biological and chemical diversity of marine sponge-derived microorganisms over the last two decades from 1998 to 2017. *Molecules*, 25(4):853.
- CONAMA - Conselho Nacional Do Meio Ambiente (2005). Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes

- ambientais para o seu enquadramento, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da União, Brasília, DF (Brasil).
- Culebras, E, Rodríguez-Avial, I, Betriu, C, Gómez, M, Picazo, JJ (2012) Rapid identification of clinical isolates of bacteroides species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe*, 18:163-165.
- Custódio, MR, Prokic, I, Steffen, R, Koziol, C, Borojevic, R, Br mmer, F, Nickel, M, Müller, WEG (1998) Primmorphs from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.*, 105(1-2):45– 59.
- Custódio, MR, Hajdu, E, Muricy, G (2004) Cellular dynamics of in vitro allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida). *Marine Biology*, 144(5):999–1010.
- Dash, HR, Mangwani, N, Chakraborty, J, Kumari, S, Das, S (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:561–571.
- Dat, TTH, Cuc, NTK, Cuong, PV, Smidt, H, Sipkema, D (2021) Diversity and antimicrobial activity of vietnamese sponge-associated Bacteria. *Marine Drugs*, 19(7):353.
- Díaz-Díaz, G, Blanco-López, MC, Lobo-Casta n, MJ, Miranda-Ordieres, AJ, Tu n-Blanco, P (2009) Chloroperoxidase modified electrode for amperometric determination of 2,4,6-trichlorophenol. *Electroanalysis*, 21(12):1348–1353.
- Dunham, P and Weissmann, G (1986) Aggregation of marine sponge cells induced by Ca pulses, Ca ionophores, and phorbol esters proceeds in the absence of external Ca. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134:1319–1326.
- Ehrlich, H, Steck, E, Ilan, M, Maldonado, M, Muricy, G, Bavestrello, G, Kljajic, Z, Carballo, JL, Schiaparelli, S, Ereskovsky, A, Schupp, P, Born, R, Worch, H, Bazhenov, VV, Kurek, D, Varlamov, V, Vyalikh, D, Kummer, K, Sivkov, VV, Molodtsov, SL, Meissner, H, Richter, G, Hunoldt, S, Kammer, M, Paasch, S, Krasokhin, V, Patzke, G, Brunner, E, Richter, W (2010) Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: biomimetic potential and applications. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 47(2):141-145.
- El-Gendy, MMA and El-Bondkly, AMA (2010) Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical

- fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37:831–841.
- Elenga-Wilson, PS, Kayath, CA, Mokemiabeka, NS, Nzaou, SAE, Nguimbi, E, Ahombo, G (2021) Profiling of indigenous biosurfactant-producing bacillus isolates in the bioremediation of soil contaminated by petroleum products and olive oil. International Journal of Microbiology, 2021.
- Erwin, PM, Olson, JB, Thacker, RW (2011) Phylogenetic diversity, host specificity and community profiling of sponge-associated bacteria in the northern Gulf of Mexico. PLoS One, 6(26806).
- Esteves, AI, Hardoim, CC, Xavier, JR, Gonçalves, JM, Costa, R (2013) Molecular richness and biotechnological potential of bacteria cultured from *Irciniidae* sponges in the north-east Atlantic. FEMS Microbiology Ecology, 85(3):519-536.
- Fieseler, L, Horn, M, Wagner, M, Hentschel, U (2004) Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in marine sponges. Appl. Environ. Microbiol., 70:3724-3732.
- Freiwald, A and Sauer, S (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature Protocols, 4:732–42.
- Garate, L, Blanquer, A, Uriz, MJ (2015) Calcareous spherules produced by intracellular symbiotic bacteria protect the sponge *Hemimycale columella* from predation better than secondary metabolites. Mar. Ecol. Prog. Ser., 523:81–92.
- Ginn, BK, Logan, A, Thomas, MLH, Van Soest, RWM (1998) *Hymedesmia canadensis* (Porifera: Poecilosclerida), a new species among new geographical records from the Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 78(4):1093-1100.
- Godefroy, N, Le Goff, E, Martinand-Mari, C, Belkhir, K, Vacelet, J, Baghdigui, S (2019) Sponge digestive system diversity and evolution: filter feeding to carnivory. Cell and Tissue Research, 377(3):341-351.
- Gopal, K, Tripathy, SS, Bersillon, JL, Dubey, SP (2007) Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. Journal of Hazardous Materials., 140(1–2):1–6.
- Govarathan, M, Fuzisawa, S, Hosogai, T, Chang, YC (2017) Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. RSC Advances, 7(34):20716-20723.

- Graça, AP, Viana, F, Bondoso, J, Correia, MI, Gomes, L, Humanes, M, Reis, A, Xavier, JR, Gaspar, H, Lage, OM (2015) The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae). *Frontiers in Microbiology*, 6:389.
- Guo, J and Wen, X (2021) Performance and kinetics of benzo(a)pyrene biodegradation in contaminated water and soil and improvement of soil properties by biosurfactant amendment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 207:111292.
- Gupta, P, Sharma, U, Schulz, TC, McLean, AB, Robins, AJ, West, LM (2012) Bicyclic C21 terpenoids from the marine sponge *Clathria compressa*. *Journal of Natural Products*, 75(6):1223-1227.
- Hahn-Keser, B and Stockem, W (1998) Intracellular pathways and degradation of endosomal contents in basal epithelial cells of freshwater sponges (Porifera, Spongillidae). *Zoomorphology*, 117:223–236.
- Hausmann, R, Vitello, MP, Leitermann, F, Syldatk, C (2006) Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba* - A model sponge for ex situ sponge biomass production. *Journal of Biotechnology*, 124(1):117-127.
- He, Q, Miao, S, Ni, N, Man, Y, Gong, K (2020) A review of the secondary metabolites from the marine sponges of the genus *Aaptos*. *Natural Product Communications*, 15(9).
- Hentschel, U, Hopke, J, Horn, M, Friedrich, AB, Wagner, M, Hacker, J, Moore, BS (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9):4431-4440.
- Hentschel, U, Piel, J, Degnan, SM, Taylor, MW (2012) Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9):641-654.
- Hentschel, U, Usher, KM, Taylor, MW (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(2):167-177.
- Hillis, DM and Bull, JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2):182-192.
- Hoffmann, F, Radax, R, Woebken, D, Holtappels, M, Lavik, G, Rapp, HT, Schläppy, ML, Schleper, C, Kuypers, MMM (2009) Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*. *Environmental Microbiology*, 11(9):2228-2243.

- Hooper, JNA and Van Soest, RWM (2002) Class Demospongiae Sollas, 1885. In: Hooper, JNA, Van Soest, RWM, Willenz, P (eds) *Systema Porifera*. Springer, Boston, MA.
- Hoppers, A, Stoudenmire, J, Wu, S, Lopanik, NB (2015) Antibiotic activity and microbial community of the temperate sponge, *Haliclona* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2):419-430.
- Huff, J (2012) Long-term toxicology and carcinogenicity of 2,4,6-trichlorophenol. *Chemosphere*, 89(5):521–525.
- Inbakandan, D, Venkatesan, R, Ajmal Khan, S (2010) Biosynthesis of gold nanoparticles utilizing marine sponge *Acanthella elongata* (Dendy, 1905). *Colloids Surfaces. B. Biointerfaces*, 81:634–639.
- Janda, JM (2014) *Shewanella*: a Marine Pathogen as an Emerging Cause of Human Disease. *Clinical Microbiology Newsletter*, 36(4):25–29.
- Jukes, TH and Cantor, CR (1969) Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 3:21-132.
- Kennedy, J, Baker, P, Piper, C, Cotter, PD, Walsh, M, Mooij, MJ, Bourke, MB, Rea, MC, O'Connor, PM, Ross, PR, Hill, C, O'Gara, F, Marchesi, JR, Dobson, AD (2009) Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*, 11(3):384-396.
- Kiran, GS, Priyadharsini, S, Sajayan, A, Ravindran, A, Selvin, J (2018) An antibiotic agent pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro isolated from a marine bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 effectively controls multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, 8(32):17837-17846.
- La Scola, B, Fournier, PE, Raoult, D (2011) Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe*, 17:106-112.
- Laport, MS, Santos, OCS, Muricy, G (2009) Marine Sponges: Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1):86-105.
- Lavy, A, Keren, R, Haber, M, Schwartz, I, Ilan, M (2014) Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2):486-502.
- Lerner, C, Mothes, B, Carraro, JL (2005) Novos registros e ampliação de limites meridionais de distribuição de poríferos (Porifera, Demospongiae) no Atlântico sudoeste. *Rev. Bras. Zool.*, 22(3):596-612.

- Li, XZ, Plésiat, P, Nikaido, H (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(2):337-418.
- Lu, C, Hong, Y, Liu, J, Gao, Y, Ma, Z, Yang, B, Ling, W, Waigi, MG (2019) A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation. *Environmental Pollution*, 251:773-782.
- Lysek, N, Kinscherf, R, Claus, R, Lindel, T (2003) L-5-Hydroxytryptophan: Antioxidant and Anti-Apoptotic Principle of the Intertidal Sponge *Hymeniacidon heliophila*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8):568-572.
- Mahaut, ML, Basuyaux, O, Baudinière, E, Chataignier, C, Pain, J, Caplat, C (2013) The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5):2984-2992.
- Maldonado, M (2007) Intergenerational transmission of symbiotic bacteria in oviparous and viviparous demosponges, with emphasis on intracytoplasmically-compartmented bacterial types. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(6):1701-1713.
- Maldonado, M, Ribes, M, Van Duyl, FC (2012) Nutrient fluxes through sponges: biology, budgets, and ecological implications. *Advances In Marine Biology*, 62:113-182.
- Marzuki, I, Septiningsih, E, Kaseng, ES, Herlinah, H, Sahrijanna, A, Sahabuddin, S, Asaf, R, Athirah, A, Isnawan, BH, Samidjo, GS, Rumagia, F, Hamidah, E, Santi, IS, Nisaa, K (2022) Investigation of global trends of pollutants in marine ecosystems around Barrang Caddi Island, Spermonde archipelago cluster: an ecological approach. *Toxics*, 10(6):301.
- Marzuki, I, Sinardi, S, Pratama, I, Chaerul, M, Paserangi, I, Mudyawati, M, Asaf, R (2021) Performance of sea sponges micro symbionts as a biomaterial in biodegradation naphthalene waste of modified. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 737(1):012016.
- Mellmann, A, Cloud, J, Maier, T, Keckevoet, U, Ramminger, I, Iwen, P, Dunn, J, Hall, G, Wilson, D, LaSala, P, Kostrzewa, M, Harmsen, D (2008) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:1946–54.

- Ministério Da Saúde (2011) Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF.
- Moitinho-Silva, L, Steinert, G, Nielsen, S, Hardoim, CC, Wu, YC, McCormack, GP, López-Legentil, S, Marchant, R, Webster, N, Thomas, T, Hentschel, U (2017) Predicting the HMA-LMA status in marine sponges by machine learning. *Frontiers In Microbiology*, 8:752.
- Montalvo, NF and Hill, RT (2011) Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:7207–7216.
- Müller, WEG (1998) Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwissenschaften*, 85:11-25.
- Murakami, S, Tamura, N, Saito, A, Hirata, T, Yamaguchi, A (2004) Extramembrane central pore of multidrug exporter ACRB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport. *J. Biol. Chem.*, 279(5): 3743-3748
- Muricy, G and Hajdu, E (2006) Porifera Brasilis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Série Livros 17. Museu Nacional. Rio de Janeiro.
- Murray, PR (2012) What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J. Mol. Diagn.*, 14(5):419-423.
- Nascimento-Silva, G, Hardoim, CCP, Custódio, MR (2022) The Porifera microeukaryome: addressing the neglected associations between sponges and protists. *Microbiol. Res.*, 265.
- Nedoroda, V, Trokhymenko, G, Khrapko, T, Koliehova, A (2021). Analysis of petroleum biodegradation by a bacterial consortium of *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *Plantarum* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ecological Engineering*, 22(11):36-42.
- Nguyen, MT, Liu, M, Thomas, T (2014) Ankyrin-repeat proteins from sponge symbionts modulate amoebal phagocytosis. *Mol. Ecol.*, 23:1635–1645.
- Pabel, CT, Vater, J, Wilde, C, Franke, P, Hofemeister, J, Adler, B, Bringmann, G, Hacker, J, Hentschel, U (2003) Antimicrobial activities and matrix-assisted laser

- desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*, 5(5):424-434.
- Padeniya, U, Larson, ET, Septriani, S, Pataueg, A, Kafui, AR, Hasan, E, Mmaduakonam, OS, Kim, GD, Kiddane, AT, Brown, CL (2022) Probiotic treatment enhances pre-feeding larval development and early survival in zebrafish *Danio rerio*. *J. Aquat. Anim. Health*, 34:3-11
- Palomo, S, González, I, De la Cruz, M, Martín, J, Tormo, JR, Anderson, M, Hill, RT, Vicente, F, Reyes, F, Genilloud, O (2013) Sponge-Derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Marine Drugs*, 11(4):1071-1086.
- Patel, B, Patel, S, Balani, MC (1985) Can a sponge fractionate isotopes?. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 224:23–41.
- Paul, VJ, Freeman, CJ, Agarwal, V (2019) Chemical ecology of marine sponges: new opportunities through “-omics”. *Integrative and Comparative Biology*, 59(4):765–776.
- Perdicaris, S, Vlachogianni, T, Valavanidis, A (2013) Bioactive natural substances from marine sponges: new developments and prospects for future pharmaceuticals. *Nat. Prod. Chem. Res.*, 1:2–10.
- Perez, T, Wafo, E, Fourt, M, Vacelet, J (2003) Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: concentration and fate of 24 congeners. *Environmental Science & Technology*, 37(10):2152-2158.
- Perez, T, Sarrazin, L, Rebouillon, P, Vacelet, J (2002) First evidences of surfactant biodegradation by marine sponges (Porifera): an experimental study with a linear alkylbenzenesulfonate. *Hydrobiologia*, 489(1):225-233.
- Perpétuo, EA, Da Silva, ECN, Karolski, B, Nascimento, CAO (2020) Biodegradation of diethyl-phthalate (DEP) by halotolerant bacteria isolated from an estuarine environment. *Biodegradation*, 31:331-340
- Pianowski, EH and, Janissek PR (2003) Desinfecção de efluentes sanitários com uso de cloro: avaliação da formação de trihalometanos. *Sanare: Revista Técnica da Sanepar*, 20(20):6-17.
- Pile, AJ and Young, C (2006) The natural diet of a hexactinellid sponge: benthic-pelagic coupling in a deep-sea microbial food web. *Deep-Sea Res.*, 53:1148-1156.

- Pruesse, E, Peplies, J, Glöckner, FO (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28(14):1823-1829.
- Rabbee, MF, Ali, MS, Choi, J, Hwang, BS, Jeong, SC, Baek, KH (2019) *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6):1046.
- Rachanamol, RS, Lipton, AP, Thankamani, V, Sarika, AR, Selvin, J (2014) Molecular characterization and bioactivity profile of the tropical sponge-associated bacterium *Shewanella algae* VCDB. *Helgoland Marine Research*, 68(2):263-269.
- Ramos-Ramírez, E, Martínez-Gómez, C, Tzompantzi-Morales, F, del Ángel-Montes, GA, Mendoza-Damián, G, Gutiérrez-Ortega, NL (2015) Degradación del 2, 4, 6-triclorofenol usando hidrotalcitas calcinadas Mg/Al como fotocatalizadores. *Superficies y Vacío*, 28(3):92-98.
- Rathna, J, Bakkiyaraj, D, Pandian, SK (2016) Anti-biofilm mechanisms of 3,5-di-tert-butylphenol against clinically relevant fungal pathogens. *Biofouling*, 32(9):979-993.
- Reimer, A, Blohm, A, Quack, T, Grevelding, CG, Kozjak-Pavlovic, V, Rudel, T, Hentschel, U, Abdelmohsen, UR (2015) Inhibitory activities of the marine streptomycete-derived compound SF2446A2 against *Chlamydia trachomatis* and *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Antibiotics*, 68(11):674-679.
- Reintamm, T, Lopp, A, Kuusksalu, A, Pehk, T, Kelve, M (2003) ATP N-glycosidase—a novel ATP-converting activity from a marine sponge *Axinella polypoides*. *European Journal of Biochemistry*, 270(20):4122-4132.
- Reiswig, HM (1971) Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *The Biological Bulletin*, 141(3).
- Reveillaud, J, Maignien, L, Eren, AM, Huber, JA, Apprill, A, Sogin, ML, Vanreusel, A (2014) Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *The ISME Journal*, 8(6):1198-1209.
- Rozas, EE, Albano, RM, Lôbo-Hajdu, G, Müller, WE, Schröder, HC, Custódio, MR (2011) Isolation and cultivation of fungal strains from in vitro cell cultures of two marine sponges (Porifera: Halichondrida and Haplosclerida). *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:1560-1568.
- Rozas, EE, Mendes, MA, Nascimento, CA, Espinosa, DC, Oliveira, R, Oliveira, G, Custodio, MR (2017) Bioleaching of electronic waste using bacteria isolated from

- the marine sponge *Hymeniacidon heliophila* (Porifera). *Journal of Hazardous Materials*, 329:120-130.
- Rozas, EE, Mendes, MA, Custódio, MR, Espinosa, DCR, Nascimento, CAO (2019) Self-assembly of supramolecular structure based on copper-lipopeptides isolated from e-waste bioleaching liquor. *J. Haz. Mat.*, 368:61-71.
- Rua, CP, Trindade-Silva, AE, Appolinario, LR, Venas, TM, Garcia, GD, Carvalho, LS, Lima, A, Kruger, R, Pereira, RC, Berlinck, RGS, Valle, RAB, Thompson, CC, Thompson, F (2014) Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Peer J.*, 2e419.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Santos-Gandelman, JF, Santos, O, Pontes, PV, Andrade, CL, Korenblum, E, Muricy, G, Giambiagi-deMarval, M, Laport, MS (2013) Characterization of cultivable bacteria from Brazilian sponges. *Marine Biotechnology*, 15(6):668-676.
- Santos-Gandelman, JF, Giambiagi-deMarval, M, Oelemann, W, Laport, M (2014) Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(2):143-155.
- Sato, H, Teramoto, K, Ishii, Y, Watanabe, K, Benno, Y (2011) Ribosomal protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for phylogeny-based subspecies resolution of *Bifidobacterium longum*. *Systematic And Applied Microbiology*, 34(1):76-80.
- Sawhney, S, Mishra, JK, Banu, VS (2018) Antibacterial activity of *Bacillus velezensis* CHB2, an endosymbiont of marine sponge *Biemna fortis* (Topsent, 1897) from South Andaman coast, India. *Int. J. Basic Appl. Res.*, 8(9):1012-23.
- Schippers, KJ, Sipkema, D, Osinga, R, Smidt, H, Pomponi, SA, Martens, DE, Wijffels, RH (2012) Cultivation of sponges, sponge cells and symbionts: achievements and future prospects. *Advances In Marine Biology*, 62:273-337.
- Schläppy, ML, Schöttner, SI, Lavik, G, Kuypers, MM, de Beer, D, Hoffmann, F (2010) Evidence of nitrification and denitrification in high and low microbial abundance sponges. *Marine Biology*, 157(3):593-602.
- Schröder, HC, Brandt, D, Schloßmacher, U, Wang, X, Tahir, MN, Tremel, W, Belikov, SI, Müller, WE (2007) Enzymatic production of biosilica glass using enzymes

- from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine). *Naturwissenschaften*, 94(5):339-359.
- Selvin, J, Priya, SS, Kiran, GS, Thangavelu, T, Bai, NS (2009) Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiological Research*, 164(3):352-363.
- Sepay, N, Sekar, A, Halder, UC, Alarifi, A, Afzal, M (2021) Anti-COVID-19 terpenoid from marine sources: A docking, admet and molecular dynamics study. *Journal of Molecular Structure*, 1228:129433.
- Shariati, S, Pourbabaee, AA, Alikhani, HA, Rezaei, KA (2022) Anaerobic biodegradation of phthalic acid by an indigenous *Ralstonia pickettii* strain SHAn2 isolated from Anzali international wetland. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 19:4827–4838.
- Simpson, T.L. (1984). *The cell biology of sponges*. Springer-Verlag, New York. p.622.
- Starostin, KV, Demidov, EA, Bryanskaya, AV, Efimov, VM, Rozanov, AS, Peltek, SE (2015) Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports*, 5(1):1-9.
- Stearns, SC and Hoekstra, RF (2003) *Evolução: uma introdução*. Atheneu, 379.
- Syafrudin, M, Kristanti, RA, Yuniarto, A, Hadibarata, T, Rhee, J, Al-Onazi, WA, Algarni, TS, Almarri, AH, Al-Mohaimed, AM (2021) Pesticidas na água potável - uma revisão. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2):468.
- Tai, C and Jiang, G (2005) Dechlorination and destruction of 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol using hydrogen peroxide as the oxidant catalyzed by molybdate ions under basic condition. *Chemosphere*, 59(3):321–326.
- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731-2739.
- Taylor, MW, Radax, R, Steger, D, Wagner, M (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2):295-347.
- Taylor, MW, Schupp, PJ, Dahllöf, I, Kjelleberg, S, Steinberg, PD (2004) Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 6(2):121-130.

- Teramoto, K, Sato, H, Sun, L, Torimura, M, Tao, H, Yoshikawa, H, Hotta, Y, Hosoda, A, Tamura, H (2007) Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Analytical Chemistry*, 79(22):8712-8719.
- Thomas, T, Moitinho-Silva, L, Lurgi, M, Björk, JR, Easson, C, Astudillo-García, C, Olson, JB, Erwin, PM, López-Legentil, S, Luter, H, Chaves-Fonnegra, A, Costa, R, Schupp, PJ, Steindler, L, Erpenbeck, D, Gilbert, J, Knight, R, Ackermann, G, Lopez, JV, Taylor, MW, Thacker, RW, Montoya, JM, Hentschel, U, Webster, NS (2016) Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, 7(1):1-12.
- Thomas, TRA, Kavlekar, DP, Bharathi, PAL (2010) Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. *Mar. Drugs*, 8:1417–1468.
- Tianero, MD, Balaich, JN, Donia, MS (2019) Localized production of defence chemicals by intracellular symbionts of *Haliclona* sponges. *Nat. Microbiol.*, 4:1149–1159.
- Toby Kiers, E, Palmer, TM, Ives, AR, Bruno, JF, Bronstein, JL (2010) Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology Letters*, 13(12):1459-1474.
- Turque, AS, Batista, D, Silveira, CB, Cardoso, AM, Vieira, RP, Moraes, FC, Clementino, MM, Albano, RM, Paranhos, R, Martins, OB, Muricy, G (2010) Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. *PLoS One*, 5(12)e15774.
- Turque, AS, Cardoso, AM, Silveira, CB, Vieira, RP, Freitas, FA, Albano, RM, Gonzalez, AM, Paranhos, R, Muricy, G, Martins, OB (2008) Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 155(2):135-146.
- Vacelet, J (1975) Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J Microsc. Biol. Cell.*, 23(3):271–288.
- Vacelet, J and Donadey, C (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30:301–314.
- Vacelet, J and Duport, E (2004) Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). *Zoomorphology*, 123:179-190.

- Van Soest, RW and De Voogd, NJ (2018) Calcareous sponges of the western Indian Ocean and Red Sea. *Zootaxa*, 4426(1):1-160.
- Varijakzhan, D, Loh, JY, Yap, WS, Yusoff, K, Seboussi, R, Lim, SHE, Lai, KS, Chong, CM (2021) Bioactive compounds from marine sponges: fundamentals and applications. *Marine Drugs*, 19(5):246.
- Veloo, ACM, de Vries, ED, Jean-Pierre, H, Justesen, US, Morris, T, Urban, E, Wybo, I, Van Winkelhoff, AJ, Morris, T, Shah, H, Jean-Pierre, H, Justesen, US, Nagy, E, Urban, E, Kostrzewa, M, Veloo, A, Van Winkelhoff, AJ, Friedrich, AW (2016) The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(9):793-798.
- Veloo, ACM, Jean-Pierre, H, Justesen, US, Morris, T, Urban, E, Wybo, I, Kostrzewa, M, Friedrich, AW, Morris, T, Shah, H, Jean-Pierre, H, Justesen, US, Wybo, I, Nagy, E, Urban, E, Kostrzewa, M, Veloo, A, Friedrich, AW (2018) Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. *Anaerobe*, 54:224-230.
- Venkateswara Rao, J, Srikanth, K, Pallela, R, Gnaneshwar Rao, T (2009) The use of marine sponge, *Haliclona tenuiramosa* as bioindicator to monitor heavy metal pollution in the coasts of Gulf of Mannar, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156(1):451-459.
- Vijayakumar, K and MuhilVannan, S (2021) 3, 5-Di-tert-butylphenol combat against *Streptococcus mutans* by impeding acidogenicity, acidurance and biofilm formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12):1-13.
- Wang, G (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7):545.
- Webster, NS and Taylor, MW (2012) Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology*, 14(2):335-346.
- Webster, NS, Taylor, MW, Behnam, F, Lückner, S, Rattei, T, Whalan, S, Horn, M, Wagner, M (2010) Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environmental Microbiology*, 12(8):2070-2082.

- Webster, NS, Webb, RI, Ridd, MJ, Hill, RT, Negri, AP (2001) The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environmental Microbiology*, 3(1):19-31.
- Wehrl, M, Steinert, M, Hentschel, U (2007) Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial Ecology*, 53(2):355-365.
- Weigel, BL and Erwin, PM (2016) Intraspecific variation in microbial symbiont communities of the sun sponge, *Hymeniacidon heliophila*, from intertidal and subtidal habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2):650-658.
- Weigel, BL and Erwin, PM (2017) Effects of reciprocal transplantation on the microbiome and putative nitrogen cycling functions of the intertidal sponge, *Hymeniacidon heliophila*. *Scientific Reports*, 7(1):1-12.
- Weisburg, WG, Barns, SM, Pelletier, DA, Lane, DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697-703.
- Winefordner, JD (2006) Identification of microorganisms by mass spectrometry. CL Wilkins, and JO Lay (Eds.). Hoboken, NJ: John Wiley.
- Wise, SA, Poster, DL, Kucklick, JR, Keller, JM, VanderPol, SS, Sander, LC, Schantz, MM (2006) Standard reference materials (SRMs) for determination of organic contaminants in environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4):1153-1190.
- Wulff, J (2001) Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how?. *Bulletin of Marine Science*, 69(2):831-846.
- Zahn, RK, Zahn, G, Müller, WEG, Kurelec, B, Rijavec, M, Batel, R, Given, R (1981) Assessing consequences of marine pollution by hydrocarbons using sponges as model organisms. *Science of The Total Environment*, 20(2):147-169.
- Zhang, F, Jonas, L, Lin, H, Hill, RT (2019) Microbially mediated nutrient cycles in marine sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11):155.
- Zilber-Rosenberg, I and Rosenberg, E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5):723-735.
- Zuppa, A, Costantini, S, Costantini, M (2014) Comparative sequence analysis of bacterial symbionts from the marine sponges *Geodia cydonium* and *Ircinia muscarum*. *Bioinformatics*, 10(4):196-200.

8.0 Material suplementar

Tabela S1 - Resultado da análise das vias metabólicas controle		
Vias metabólicas	Raw p (bruto)	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	1.61E-02	0.00
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	3.67E-02	0.02
Novobiocin biosynthesis	9.99E-02	0.00
Glycerolipid metabolism	1.61E-01	0.06
Phenylalanine metabolism	1.61E-01	0.00
Nitrogen metabolism	2.18E-01	0.00
Tyrosine metabolism	2.72E-01	0.00
Glycolysis / Gluconeogenesis	2.77E-01	0.02
Pentose and glucuronate interconversions	2.90E-01	0.00
Taurine and hypotaurine metabolism	3.21E-01	0.00
Vitamin B6 metabolism	3.21E-01	0.00
Lysine degradation	3.68E-01	0.00
Lysine biosynthesis	4.11E-01	0.00
Sulfur metabolism	4.11E-01	0.05
Arginine biosynthesis	4.71E-01	0.03
Fructose and mannose metabolism	5.07E-01	0.00
Butanoate metabolism	5.25E-01	0.00
Glycerophospholipid metabolism	5.25E-01	0.32
Arginine and proline metabolism	5.73E-01	0.00
Pyruvate metabolism	5.73E-01	0.07
Pentose phosphate pathway	6.03E-01	0.00
Galactose metabolism	6.17E-01	0.00
Propanoate metabolism	6.17E-01	0.00
Methane metabolism	6.44E-01	0.00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	7.03E-01	0.00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	7.03E-01	0.00
Fatty acid degradation	7.13E-01	0.00
Cysteine and methionine metabolism	7.86E-01	0.11
Fatty acid biosynthesis	8.01E-01	0.00
Purine metabolism	9.12E-01	0.00

Tabela S2 - Resultado da análise de vias metabólicas tratado		
Vias metabólicas	Raw p (bruto)	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	1.79E-02	0.17
Nitrogen metabolism	3.14E-02	0.00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8.03E-02	0.04
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1.71E-01	0.17
Sulfur metabolism	2.17E-01	0.08
Tyrosine metabolism	2.55E-01	0.00
Carbapenem biosynthesis	2.92E-01	0.00
Novobiocin biosynthesis	2.92E-01	0.00
Arginine biosynthesis	3.09E-01	0.12
Taurine and hypotaurine metabolism	3.39E-01	0.00
Valine, leucine and isoleucine degradation	4.14E-01	0.04
Lysine degradation	4.21E-01	0.00
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4.34E-01	0.02
Phenylalanine metabolism	4.38E-01	0.00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4.64E-01	0.47
Nicotinate and nicotinamide metabolism	4.97E-01	0.00
Pentose phosphate pathway	5.50E-01	0.04
Galactose metabolism	5.76E-01	0.10
Glutathione metabolism	5.99E-01	0.17
Monobactam biosynthesis	6.03E-01	0.00
C5-Branched dibasic acid metabolism	6.46E-01	0.40
Fructose and mannose metabolism	6.58E-01	0.00
Pentose and glucuronate interconversions	6.73E-01	0.00
Pantothenate and CoA biosynthesis	6.85E-01	0.00
Streptomycin biosynthesis	6.85E-01	0.00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	7.35E-01	0.00
Arginine and proline metabolism	7.55E-01	0.07
Lysine biosynthesis	8.24E-01	0.00
Histidine metabolism	8.76E-01	0.00
Inositol phosphate metabolism	8.76E-01	0.19
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	9.01E-01	0.00
Biotin metabolism	9.02E-01	0.00

Citrate cycle (TCA cycle)	9.02E-01	0.03
Pyrimidine metabolism	9.10E-01	0.08
Glycerolipid metabolism	9.13E-01	0.00
Butanoate metabolism	9.13E-01	0.06
Thiamine metabolism	9.46E-01	0.00
Purine metabolism	9.48E-01	0.02
Propanoate metabolism	9.57E-01	0.01
Cysteine and methionine metabolism	9.59E-01	0.24
Glycolysis / Gluconeogenesis	9.70E-01	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	9.76E-01	0.00
Fatty acid degradation	9.83E-01	0.00
Fatty acid biosynthesis	9.95E-01	0.00

Tabela S3 – Resultado da análise cromatográfica do controle

Metabólitos
Ethyl amine
Propanoic acid
Acetic acid
Urea
Phlorizin
Pyrimidine
2-Butenedioic acid
2-Piperidinecarboxylic acid
L-Methionine
L-Proline
Nitric acid
L-Lysine
2,3,4-trimethyl-Hexane
Glycerophosphoric acid
Malonic acid
1,2,3-Propanetricarboxylic acid
Butanoic acid
Penicillamine
L-Tyrosine
Lyxose
Nonadecane
D-Mannitol
3,3-dimethyl-Hexane
D-Xylopyranose
Hexadecanoic acid
Indole
Octadecanoic acid
trans-3-Hexenedioic acid
1,1-diethoxy-Ethane
D-Turanose
3,7-dimethyl-1-Octanol
2-methyl-Octane

D-Glucuronic acid
1-Heptanol
Arabinofuranose
Pyridoxine
Ribitol
d-Xylose
glycerol
2,4-dimethylheptane
Trisiloxane
5-Ethyl-1-nonene
1-methyl-2-(3-methylpentyl)-Cyclopropane
4,7-dimethylundecane
2-Methyl-propane
Silanol
4-butoxy-1-Butanol
2,5-Methylene-d
2-Decanol
2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene
2,2,2-trifluoro-N-methyl-N-Acetamide
2,6-dimethyl-3-Octene
2,3,5,8-tetramethyl-Decane
Butyl aldoxime
2,4,6-Tri-t-butylbenzenethiol
4,6,8-trimethyl-1-Nonene
L-phenylalanine
1-iodooctadecane
2,6-dimethyl-3-Heptanol
Isooctanol
4-Pyrimidinecarboxylic acid
Hydroxysecobarbital glucuronide
Mannonic acid
2-methoxy-2-methyl-Propane
2-Ketoisocaproic acid oxime
Hexyl octyl ether
Docosane
2,5-Dimethyl-5-hexen-3-ol
Arabino-Hex-1-enitol

Beta-D-Galactose
Acenaphthylene
Cyclopropanethiocarboxylic acid
Scopolin
2-Deoxy-galactose
2-(O- oxyphenyl)-1- oxyethane
2-tert-Butyl-4,6-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)phenol
Silanamine
4,5-Dimethylnonane
Disiloxane
5,7-Dimethylundecane
2-Bromononane
ethyl methyl acetal
2,3,4-trihydroxybutanoic acid
2-chloro-4-methyl-3-Pentanol
2-Methylbutane-1,4-diol
2,4-dimethylpentanoate
2,2-dimethyl-1-Pentanol
1-iododecane
D-Glucose
Silane

Tabela S4 – Resultado da análise cromatográfica do tratado

Metabólitos
L-Galactopyranose
1-butyloctyloxy
Pyrrole
(3-Hydroxyphenyl)pentanoic acid
butoxymethyl oxirane
(dodecyloxymethyl)Oxirane
(E)-4-C ₉ H ₁₈
(Z)-2-Propyl-3-oxopentanoic acid
[2-[(2-ethylhexyl)oxy]ethyl]-Cyclohexane
{2,2-Dimethyl-5-[2-(2-ethoxymethoxy)propyl][1,3]dioxolan-4-yl}methanol
1-oxy-2-undecene (E)
1-(1-ethoxyethoxy)-Octane
1-(4-Bromophenyl)imidazoline-2-thione
1-3-propane
1-Acetoxy-nonadecane
1-bromo-Triacontane
1-Butaneboronic acid
1-Butanol
1-butyl-Cyclohexanol
1-chloro-4,4-dimethyl-1-Penten-3-one
1-chloro-Octadecane
1-Docosanol
1-ethoxy-3-Heptene
1-Heptacosanol
1-Heptadecanamine
1-Iodo-2-methylnonane
1-iodo-Tridecane
1-methyl-3-propyl-Cyclooctane
Glyceryl monooleate
1-Monooleoylglycerol ether
1-pentyl-2-propyl-Cyclopentane
1-propoxy-Octane

1-t-Butyldioxymethyl-4-methylpiperidine
1-Tridecanol
1,1-dichloro-1,2-Propadiene
1,1-diethoxy-Decane
1,1,3-trimethyl-Cyclohexane
1,10-Decanediol bis ether
1,12-dodecane
1,2-propane
1,2-Butadiene
1,2-Butanediol
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid
1,2-cyclohexene
1,2-dibutyl-Cyclopentane
1,2-dimethylpropyl-Cyclohexane
1,2-ethane
1,2,3-Propatriol
1,2,3-trimethoxy-Pentane
1,3-Bis benzene
1,3-Bis(oxy)pentane
1,3-Dioxolan-4-one
1,3-propane
1,3,5-Cycloheptatriene
1,30-dibromo-Triacontane
1,38-dibromooctatriacontane
1,4-dimethoxy-Cyclohexane
1,4-Dioxane
1,4-Ethanopentalen-8-one
1,5-Cyclooctanediol
11-(methyl)1-undecene
11-(1-ethylpropyl)-Heneicosane
11-cyclopentyl-Heneicosane
11-Eicosenoic acid
13-Tetradecen-1-ol acetate
13,16-Octadecadienoic acid
15-Isopropenyl-3- oxacyclopentadecan-2-one
Indole
1H-Indole-2,3-dione

1H-Isoindole-1,3(2H)-dione
2-(3-bromophenyl)-1,3-Dioxolane
2-(5-[1,3]Dioxolan-2-yl-pentyl)-3-methylaziridine
2-(octadecyloxy)-Ethanol
2-(Prop-2-enoyloxy)tetradecane
Imidazole
2-amino-7,8-dihydro-8-methyl-6,7-diphenyl-4(3H)-Pteridinone
2-Butenal
2-Butenedioic acid (Z)
2-Butenoic acid
2-Decenoic acid
2-Deoxy ribose
2-ethoxyethoxy
2-Ethyl-1,3-bis(oxy)propane
2-Ethyl-3- oxy butyrate
2-ethyl-4-methoxy-Cyclohexanone
2-Ethylcyclohexanol
2-Furanacetaldehyde
2-Furanacetic acid
2-Heptadecanol
2-Hexadecanol
trans-2-Hexenoic acid
2-isohexyl-6-methyl-1-Heptene
3-methyl-2-oxopentanoate
2-Ketoisovaleric acid oxime
2-Methyl-1-propane
2-methyl-2-Undecanethiol
2-methyl-3-(1-methylethyl)-1-(2-propenyl)-Aziridine
2-methyl-3-Octanol
2-methyl-5-Nonanone
2-Methyl-Z-4-tetradecene
2-Methyl-Z-7,8-epoxyhexadecen
2-Mono-isobutyryn
2-Monooleoylglycerol
2-Monopalmitin ether
2-Monostearin ether
2-O-Glycerol-alpha-d-galactopyranoside

2-Pentenedioic acid
2-Pentenoic acid
2-Propanol
2-propyl-1-Heptanol
2-Pteridinamine
2-t-Butyl-5-chloromethyl-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylic acid
2-Undecenoic acid
2,2-Dimethyl-1-aza-spiro[2.3]hexane
2,2-dimethyl-1-Decanol
2,2-Dimethyl-1-propane
2,2-Dimethyl-5-[2-(2-ethoxymethoxy)-propyl]-[1,3]dioxolane-4-carboxaldehyde
2,2-dimethyl-Cyclohexanol
2,2,2-trifluoro-N-methyl-N-Acetamide
2,2,6,6-tetramethylpiperidine
2,3-dihydro-5H-1,4-Dioxepin
2,3-Dimethoxyphenyllactic acid
2,3-dimethyl-Nonadecane
2,3,3-trimethyl-Pentane
2,3,4,6-Tetra-O-1-[1,7-dicarba-closo-dodecaboran-(12)-1-yl]-D-glucopyranose
2,3,6,7-tetramethyl-Octane
2,4-diethyl-5-methyl-6-propyl-1,3,2-Dioxaborinane
2,4-dimethyl-1-Heptanol
2,4-dimethyl-1,3-Cyclopentanedione
2,4-dimethyl-3-Heptanol
2,5-anhydro-1-O-octyl-d-Glucitol
2,5-Monoformal-l-rhamnitol
Succinimide
2,6-Dimethyl-6-trifluoroacetoxyoctane
2,6,10,14-Tetramethylpentadecan-2-ol
2,6,11-trimethyl-Dodecane
2,6,11,15-tetramethyl-Hexadecane
2,7-Dioxatricyclo[4.4.0.0(3,8)]decane-4,5-diol
3-(1-ethoxyethoxy)-2-Methylbutane-1,4-diol
3-(Dimethylamino)-2-methyl-2-propenal
Batyl Alcohol
3-(Prop-2-enoyloxy)tridecane
3-Dodecanone

3-Ethoxypropionic acid
3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-Octadecane
3-Ethyl-6- oxyoctane
3-Heptafluorobutyroxy-pentadecane
3-Heptafluorobutyroxy-6-ethyldecane
3-Hydroxy glutaric acid
3-methoxy-2-(methoxymethyl)-2-methyl-1-Propanol
3-methoxy-Cyclohexanone
3-Methyl-4- butyrate
3-methyl-5-propyl-Nonane
3-methyl-Uridine
3-Methylene-1,4-bis(oxy) butane
3-Pyridinecarboxylic acid
3-Quinuclidinol
3-Trifluoroacetoxypentadecane
3,12-Dioxa-tetradecane
3,3-dimethyl-4-methylene-1,2-bis(oxymethyl)-Cyclopentene
3,4-dihydro-6-methyl-2H-Pyran
3,4-dimethyl-2-Pentene
3,4,5,6-tetrahydro-7-methoxy-2H-Azepine
3,4,5,6-tetramethyl-Octane
3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-Phenol
3,5-Decadien-7-yne
3,6,9,12-Tetraazatetradecane-1,14-diamine
3,7-dimethyl-Decane
3,7-dimethyl-Nonane
3,7,11,15-tetramethyl-2-Hexadecene
3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecanol ether
3,9-diethyl-6-Tridecanol
3,trans-(1,1-dimethylethyl)-4,trans-methoxycyclohexanol
cuminaldehyde
4-Dodecanol
4-Fluoro-1-methyl-5-carboxylic acid
4-Heptafluorobutyroxyhexadecane
4-Heptanone
4-Hexadecanol
Vanylglycol

4-I-Propylcarbamoyl-1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-3-oxide
4-Ketoglucose
4-Methyl-1,2-bis(oxy)pentane
4-methyl-Tridecane
4-O-decyl-d-Glucitol
4-Octanone
4-octyldodecyl-Cyclopentane
4-Pentadecanol
4-Pentenoic acid
4-Pyrimidinamine
4-Trifluoroacetoxylhexadecane
5-(2-methylpropyl)-Nonane
5-(3-{2,2-Dimethyl-5-[2-(2- ethoxymethoxy)propyl][1,3]dioxolan-4-yl}acryloyloxy)hex-2-enoic acid
5-butyl-Nonane
5-Decene
5-Hexen-2-one
5-hydroxy-2-methyl-4(1H)-Pyrimidinone
5-Isoxazolidinecarboxylic acid
5-Methyl-7-phenyl-1,3-diazaadamantane
5-propyl-Nonane
5-Tridecanone
5,5-Dibutylnonane
5,6-dimethyl-Decane
5H,10H-Dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-5,10-dione
6-(4-Hydroxy-6-methoxy-2-methyl-tetrahydro-pyran-3-yloxy)-2-methyl-dihydro-pyran-3-one
6-ethyl-2-methyl-Octane
6-ethylundecane
6-methyl-1-Heptanol
6,10-Dimethyl-4-undecanol
6H-Pyrazolo[1,2-a][1,2,4,5]tetrazine
7-ethyl-2-methyl-4-Undecanone
7-Ketooctanoic acid oxime
7-methyl-1H-Indole
7-methyl-1-Undecene
8-methyl-Heptadecane

8-Octadecenal
9-Decen-1-ol
Acetone
Adenine
Altronic acid
Anhydro-d-mannosan
Azacyclohexane
Aziridine
Benzaldehyde
Benzene
Benzenepropanoic acid
Benzoic acid
Benzoic acid 2-methoxy-3-(4-methoxy-2-methyl-4-oxobutanoyl)-6-methyl
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-amine
bromosuccinate
1,2-propanediol phosphate
Bis(2-ethylhexyl) maleate
Butanal
Butane
Butanedioic acid
Carbamic acid
Carbonic acid
Cholan-24-oic acid
Cholest-5-en-3-ol
cholest-5-ene-3,7-diol
Cholestan-2-amine
cis-2-Ethylcyclopentanecarboxaldehyde
Cyclododecanone
Cyclohexane
Cyclohexanemethanamine
Cyclohexanone
Cyclooctene
Cyclopentane
Cyclopentane-1,2,4-trione
Cyclopentanecarboxylic acid
D-Erythro-Pentitol
D-Erythro-Pentofuranose

D-Erythrose
d-Galactitol
D-Galactofuranoside
D-Galactonic acid
D-Galactopyranoside
D-Galactose
D-Galactoside
d-Glucitol
D-Glucose
D-Glycero-L-manno-Heptonic acid
D-Lyxofuranoside
D-Mannopyranose
d-mannopyranosyl-d-glucitol
D-Ribo-Hexitol
D-Ribofuranose
D-Ribonic acid
D-Ribose
D-Xylofuranose
Decane
Di-n-octyl phthalate
DL-Lyxopyranose
Docane
Dodecyl acrylate
E-11,13-Tetradecadien-1-ol
E-9-Tetradecenol
2-deoxy-D-ribonate
Erythrose
Ethanesulfonic acid
Ethene
Glycerol
Ethyl 1-thio-l-arabinofuranoside
Ethylphosphonic acid
Fructose benzoyl oxime
Galactose
Glucitol
Glucofuranoside
Gluconic acid

Glucosamine
Glutamine
Glycol
Glycoside
Gulonic acid
Gulose
Heptafluorobutyric acid
Heptanedioic acid
Heptanoic acid
Hexanedioic acid
Hexanoic acid
Hydroxy-diphenacetic acid
Hydroxybutyric acid
Indeno[5,4-d]pyrano[4,3-c]isobenzofuran
Scyllo-inosose
Isoborneol
Isocitric lactone
Keto isovaleric acid enol
L-Cysteine
L-Glutamic acid
L-Leucine
l-Mannopyranose
L-Norleucine
L-Tyrosine
L-Valine
maleate
Mannofuranoside
Mannose
Menthyl methylmalonate
Mercaptoacetic acid
Methanamine
Methanol
Methoxycarbonyl isothiocyanate
Methyl 2-diethylamino-3-methyl-but-3-enoate
Methyl 3-methoxytetradecanoate
Methyl-d-ribofuranoside
Methylenecyclopropane

Methylmaleic acid
N-(2-methylpropyl)-N-nitroso-Octadecanamide
N-Acetyl-1-[4-chlorophenyl]-2-[4-piperidyl]-n-propanol
n-Heptyl acrylate
N-methylpyridine-3-carboxamide
N-methyl-N-nitroso-1-Dodecanamine
N-methyl-N-nitroso-1-Octanamine
N-methyl-N-octyl-Nonylamine
N-nitro-N-propyl-1-Butanamine
n-Pentadecanoic acid
N,N-diethyl-Dodecanamide
N,N'-1,3-propanediylbis-Formamide
Urea
L-phenylalanine
l-isoleucine
Nonadecanoic acid
Nonahexacontanoic acid
Nonanoic acid
Oct-2-enoic acid
octadecane
Oxanilic acid
Oxirane
Oxiraneethanol
Palmitic acid
Parabanic acid
pent-1-ene-1,3,5-triol
Pentacosanoic acid
Pentadecanal
Pentanedioic acid
D-Arabonic acid
Phenylethanolamine
Phosphorous acid
Phthalic acid
Piperazine
Pregn-5-en-11-one
Probucol
Propane

Propane(dithioic) acid
Propanedioic acid
Propanetriol
Prosta-5,13-dien-1-oic acid
Pyrazine
Pyridine
Pyrido[1,2-c]pyrimidin-3-one
Pyrrole-2-carboxylic acid
Ribonic acid
succinate
Succinic acid
Sulphuric acid
t-Butyl-(4-methyl-dodec-3-enyloxy)
t-Butyl[3-methyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-oxiran-2-yl]-methanone
Tetradecan-1-ol
tetradecane
Tetrapentacontane
thiodiglycol
Thymol-d-glucopyranoside
trans-2,3-Epoxydecane
trans-2,3-Epoxynonane
undecane
Undecanoic acid
Undecenoic acid
Uridine
Valeric acid
Xylitol
Yohimbine
Z-8-Tetradecen-1-ol acetate
Zirconium
1,1-diethoxy-Ethane
1,2,3-Propanetricarboxylic acid
2,3,4-trimethyl-Hexane
2-Butenedioic acid
2-methyl-Octane
2-Piperidinecarboxylic acid
3,7-dimethyl-1-Octanol

Arabinofuranose
D-Glucuronic acid
D-Mannitol
D-Xylopyranose
d-Xylose
l-Lysine
L-Methionine
L-Proline
Lyxose
Malonic acid
Nitric acid
Nonadecane
Penicillamine
Phlorizin
Ribitol
Tyrosine