



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Microbiota associada aos cnidários *Millepora alcicornis*,
Mussismilia harttii e *Phyllogorgia dilatata*: diversidade
microbiana e análise da ação antimicrobiana.**

Juliana Araújo Carneiro

Orientadora: Dra Simoni Campos Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**BRASÍLIA 2022.
AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas. Que me deu a oportunidade de conquistar mais essa etapa. Aquele que está sempre a frente da minha vida em tudo.

Agradeço a minha família, pelos ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos, pelo apoio e força que sempre se mostraram presente em minha vida todas as vezes que precisei. Sou uma pessoa abençoada com verdadeiros amigos.

Agradeço imensamente a minha orientadora Simoni Campos Dias, que acreditou em mim, as vezes até mais que eu mesma. Sem esse apoio e confiança nada disso seria possível.

Agradeço ao Projeto Coral Vivo pela parceria, coleta e disponibilidade dos Corais estudados nesse trabalho.

Agradeço a Universidade Católica de Brasília – UCB por abrir as portas dos laboratórios, onde pude fazer minha pesquisa.

Agradeço a UnB, PPG em Biologia Animal pelo auxílio financeiro que contribuiu para a conclusão desse trabalho.

Agradeço a Vice-coordenadora do PPG em Biologia Animal Mônica Pereira Garcia pelo incentivo e apoio recebido nos momentos que me desesperei.

Agradeço a Maria Wanna Macedo que além de companheira de laboratório, foi amiga e muitas vezes puxou minha orelha e por vários momentos impediu meus surtos, me acalmando com doces maravilhosos.... hummm.

Agradeço a Silvia Elena Tolfo que a vida me presentiu como mãe na ciência e que até hoje aprendo muito com ela.

Agradeço a todas as pessoas que conheci nessa caminhada que me ajudaram muito a chegar até aqui.

Agradeço a Érika Mots Herenio por toda ajuda desprendida nesses últimos meses. Que me tirou de vários sufocos. Rsrrsrs.

Agradeço a Alessandra Godoi, uma pessoa muito atenciosa, com quem dividi muitos surtos e desesperos.

Agradeço aos técnicos do laboratório da Católica Samuel e Fernanda pela ajuda e por muitas vezes nos socorrer em momentos de correria.

Meu muito obrigada!!!

“Grandes espíritos sempre encontraram violenta oposição de mentes medíocres. A mente medíocre é incapaz de compreender o homem que se recusa a se curvar cegamente aos preconceitos convencionais e escolhe expressar suas opiniões com coragem e honestidade.”

Albert Einstein.

RESUMO

Os recifes de coral são importantes ecossistemas marinhos e possuem tipos de organismos associados aos recifes, incluindo corais, peixes, bentos, algas e microrganismos. Os microrganismos marinhos são descritos possuidores de importantes fontes de moléculas participantes da reciclagem de compostos orgânicos ou até mesmo na inibição de organismos patogênicos. Dessa forma, a compreensão da diversidade microbiana marinha, assim como também a prospecção de agentes antimicrobianos e outros metabólitos sintetizados por esses organismos podem apresentar um papel fundamental no desenvolvimento de produtos terapêuticos biotecnológicos. Este trabalho tem como objetivo identificar os diferentes isolados de bactérias associados de três espécies de cnidários coletados em Arraia D'ajuda, Bahia: *Mussismilia harttii*, *Millepora alcicornis* e *Phyllogorgia dilatata* e posteriormente a possível presença de moléculas antimicrobianas oriundas destes cultivos microbianos. Inicialmente a partir dos fragmentos de coral e parte da água que estava junto ao coral foi realizado o isolamento das bactérias, em ágar Marinho e ágar SWA em diferentes diluições, totalizando 182 colônias isolados, destas 122 isolados foram obtidas em meio marinho, o restante (60 colônias) foram oriundas do meio SWA. No caso do meio ágar marinho, foram 91 isolados da água e 31 isolados obtidos dos corais. No meio SWA foram obtidos 08 isolados proveniente do coral e 52 isolados da água. Em relação aos morfotipos das colônias, obteve-se uma prevalência de colônias pequenas, circular de borda lisa e cremosa, sendo a morfologia dos isolados predominante bacilos pequenos. Após a caracterização morfológica e tintorial dos isolados foram realizados testes de atividade antimicrobiana contra cepa ATCC de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em 5 meios diferentes: LB, CN, ágar Marinho, SWA e TSB. Dos meios utilizados somente dois, LB e NA, apresentaram atividade antimicrobiana positiva para 20 isolados, sendo que 4, provenientes de coral, apresentaram atividade contra *E. coli* ou *S. aureus* e 16 isolados provenientes da água. Estes isolados com atividade antimicrobiana tiveram seu DNA purificado e sequenciado por caracterização molecular por 16S. Posteriormente os 182 isolados obtidos foram avaliados quanto a presença de genes que codificam moléculas antimicrobianas denominadas policetídeos. Dos 20 isolados bacterianos, que apresentaram atividade antimicrobiana, nenhum isolado apresentou amplificação para o primer D entretanto para os primers A, P e K foram obtidos 16 isolados positivos tanto em isolados dos Corais estudados, quanto de água, totalizando 177 isolados com amplificação para algum dos três primers. Mesmo apresentando resultados promissores, ainda existe a necessidade de um estudo mais aprofundado até a obtenção de uma molécula isolada e bioativa com finalidade farmacológica.

ABSTRACT

Coral reefs are important marine ecosystems and have types of organisms associated with reefs, including corals, fish, benthos, algae and microorganisms. Marine microorganisms are described as possessing important sources of molecules participating in the recycling of organic compounds or even in the inhibition of pathogenic organisms. In this way, the understanding of marine microbial diversity, as well as the prospection of antimicrobial agents and other metabolites synthesized by these organisms, can play a fundamental role in the development of biotechnological therapeutic products. This work aims to identify the different isolates of associated bacteria from three species of cnidarians collected in Arraia D'ajuda, Bahia: *Mussismilia harttii*, *Millepora alcicornis*, and *Phyllogorgia dilatata* and later the possible presence of antimicrobial molecules from these microbial cultures. Initially, from the coral fragments and part of the water that was next to the coral, the bacteria were isolated in Marine agar and SWA agar at different dilutions, totaling 182 isolated colonies, of these 122 isolates were obtained in a marine environment, the rest (60 colonies) came from the SWA environment. In the case of marine agar medium, 91 were isolated from water and 31 were isolated from corals. In the SWA medium eight isolates were obtained from the coral and 52 isolates from the water. In relation to the morphotypes of the colonies, there was a prevalence of small, circular, smooth-edged, and creamy colonies, with the morphology of the isolates being predominantly small bacilli. After the morphological and staining characterization of the isolates, tests of antimicrobial activity against ATCC strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were carried out in five different media: LB, CN, Marine agar, SWA, and TSB. Of the media used, only two, LB and NA, showed positive antimicrobial activity for 20 isolates, of which four were from coral, showed activity against *E. coli* or *S. aureus* and 16 isolates from water. These isolates with antimicrobial activity had their DNA purified and sequenced by 16S molecular characterization. Subsequently, the 182 isolates obtained were evaluated for the presence of genes that encode antimicrobial molecules called polyketides. Of the 20 bacterial isolates that showed antimicrobial activity, none of the isolates showed amplification for primer D, however, for primers A, P, and K, 16 positive isolates were obtained, both in isolates from the studied Corals and from water, totaling 177 isolates with amplification for one of the three primers. Even with promising results, there is still a need for a more in-depth study to obtain an isolated and bioactive molecule with pharmacological purpose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coral de fogo da espécie *Millepora alcicornis*.

Figura 2 - Imagem Coral *Mussismilia harttii*.

Figura 3 - Imagem da espécie de estrutura colonial do coral *Phyllogorgia dilatata*.

Figura 4 - Representação da biossíntese de peptídeos não ribossomais nas NRPS.

Figura 5 – Procedimentos realizados para o Cultivo e Obtenção das Culturas das três espécies de Coral: *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*. (A) Amostra do Coral coletado; (B) Processo de Fragmentação do Coral; (C) Maceração do Coral para semear; (D) Contagem das culturas crescidas nos diferentes meios e amostras.

Figura 6 – Etapas dos processos para a Obtenção e o armazenamento da cultura pura. (A) Obtenção da cultura pura a partir do semeado de esgotamento de cada isolado; (B) Cultivo da cultura isolada em meio Líquido; (C) Observação do isolado crescido a fim de verificar morfologia do isolado (Microscopia Óptica - Objetiva 100x); (D) Isolado armazenado em criotubo para armazenamento em (-80°C).

Figura 7 – Representação gráfica do número de isolados bacterianos obtida dos corais *P. dilatata*, *M. harttii* e *M. alcicornis*, após isolamento em meio de ágar Marinho e SWA.

Figura 8 - Placa de Cultivo com resultado dos isolados do teste de atividade antimicrobia com o método difusão em meio, com bactérias. (A) Isolado com resultado positivo para *E. coli* em meio LB; (B) Isolado com atividade Bacteriostática para *S. aureus* em meio Caldo Nutriente.

Figura 9 – Representação gráfica apresentando a quantidade de Isolados do Coral e da água do Coral que apresentaram atividade antimicrobiana.

Figura 10 – Imagem representativa do Gênero *Vibrio*. Aumento 1440 x 1035.

Figura 11 – Imagem representativa do Gênero *Bacillus*. Aumento 500 x 375.

Figura 12 – Representação gráfica apresentando os resultados das ampliações dos difentes tipos de Primers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das Siglas determinadas para os Isolados obtidos das espécies de Coral - *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*.

Tabela 2 - Gene alvo, sequência dos primers, temperatura de anelamento utilizados nas reações de amplificação e tamanho do amplicom esperado nas reações de PCR para a busca de metabolitos secundários dos cultivos oriundo de águas e material dos cnidários

Tabela 3 - Número médio de colônias obtidas pelo plaqueamento em meio sólido das amostras de *M. alcicornis* e *P. dilatata*. e *M. harttii* nos meios: Ágar Marinho e SWA.

Tabela 4 – Descrição dos morfotipos isolados das três espécies de corais crescidos em meios de cultura Ágar Marinho.

Tabela 5 – Procedência, caracterização morfotípica e molecular e atividade microbiana dos isolados positivos nos testes microbianos.

Tabela 6 - Apresentação dos resultados dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana e a amplificação dos primers.

Apêndice 1 - Tabela com a descrição dos Isolados encontrados no meio de cultura Marinho.

Apêndice 2 - Tabela com a descrição dos Isolados encontrados no meio de cultura SWA.

Apêndice 3 - Tabela de classificação filogenética dos isolados bacterianos de *M. alcicornis*, *M. harttii* e *P. Dilatata* que apresentaram atividade antimicrobiana. A tabela mostra o grau de confiança de cada grupo taxonômico.

Apêndice 4 - Tabela de resumo dos resultados das atividades tetadas para os 182 Isolados das três espécies de Corais: *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenilação
ACP	Acylcarrier protein ou proteína transportadora de acila
AT	Acyltransferase ou aciltransferase
ATCC	AmericanType Culture Colletion
ATP	Adenosina trifosfato
CYC	Cyclase ou ciclase
DH	Dehydratase hydroxylou hidroxil desidrogenase
ER	Enoyl reductase ou enoil redutase
Gr	Gramma
GT	Glycosyl transferase ou glicosil transferase
HCl	Ácido clorídrico
K	Ketoreductase ou cetoredutase
KHz	Quilo hertz
KS	β -ketoacyl synthase ou β -cetoacil desidrogenase
LB	Luria Bertani
Ma	<i>Millepora alcicornis</i>
MA	Ágar Marinho
MT	Methyl tranferase ou metil transferase
NA	Ágar Nutriente
NC	Caldo Nutriente
NaCl	Cloreto de sódio
NRP	Non-ribosomal peptide ou peptídeo não-ribossomal
NRPS	Non-ribosomal peptide synthase ou peptídeo não-ribossomal sintetase
OD	Optical density ou densidade óptica
PCP	Proteína carreadora de peptídeo
Pd	<i>Phyllogorgia dilatata</i>
PK	Polyketide ou policetídeo
PKS	Polyketide syntase ou policetídeos sintase
RB	Réplica biológica

RNAr	Ribosomal ribonucleic acid ou ácido ribonucléico ribossomal
RNAt	Carrier ribonucleic acid ou ácido ribonucléico transportador
Rpm	Rotação por minuto
SWA	Caldo de Sais de Água do Mar Artificial
T	Tiolação
TE	Thioesterase ou tioesterase
Tm	Temperatura de melting
TSA	Tryptic Soy Broth
W	Watts
A	Alfa
B	Beta

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Os ecossistemas marinhos e os recifes de coral.....	11
1.2. Moléculas antimicrobianas extraídas do ecossistema marinho.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo gerais.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Obtenção das amostras de corais.....	24
4.2. Obtenção dos isolados bacterianos.....	24
4.3. Obtenção e armazenamento das colônias puras.....	26
4.4. Caracterização morfológica dos isolados.....	28
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
4.6. Identificação molecular dos isolados bacterianos.....	30
4.7. Prospecção dos isolados produtores de metabólitos secundários por PCR.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Cultivo, seleção e isolamento das amostras da microbiota dos cnidários.....	33
5.2. Teste de atividade antimicrobiana por difusão em meio e identificação molecular dos isolados que mostraram atividade.....	38
5.3. Prospecção de isolados produtores de metabólitos secundários por PCR.....	49
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os ecossistemas marinhos e os recifes de coral

Um dos ecossistemas mais explorados são os ecossistemas marinhos. Este representa 11% dos oceanos, contendo, em média, um terço da população marinha (RICHARDSON; GRAHAM; HOEY, 2020). Reconhecido como um dos maiores e mais espetaculares ecossistema da terra, os recifes de coral formam um cinturão amplo na região subtropical-tropical. Os recifes de coral são ambientes complexos formados por cnidários sésseis, que se estendem por toda a costa e são responsáveis pela diversidade e produtividade de ecossistemas marinhos (FREIWALD et. al., 2004; GARCIA; MATTHEWS-CASCON; FRANKLIN-JUNIOR, 2009). Este habitat atua como suporte de diversas espécies marinhas podendo chegar até profundidades de várias centenas de metros abaixo do nível do mar, sendo que, alguns autores consideram os recifes de coral rochosos como os mais diversos e espetaculares ambientes. Formam colônias variando muito de tamanho, desde pequenas colônias espalhadas em alguns metros de diâmetro até um complexo e vasto recife medindo várias dezenas de quilômetros de diâmetro. Onde sua funcionalidade pode variar devido as interações ecológicas entre peixes de recife e seu ambiente, determinando a seleção de habitat (RICHARDSON; GRAHAM; HOEY, 2020).

Os corais marinhos são organismos invertebrados sésseis com alimentação de suspensão, vivendo em simbiose com organismos microbianos, composto por endossimbiótico dinoflagelados, algas endolíticas, fungos, alveolatos, bactérias, arqueias e vírus. Esses microrganismos estão associados interno/a e externamente, referido como holobiont. Esses microrganismos associados estão envolvidos no suprimento extra de carbono e nitrogênio do hospedeiro, participando da ciclagem e desintoxicação de nutrientes, proteção UV, troca genética e defesa química do animal (WATER; ALLEMAND; FERRIER-PAGÈS, 2018).

Os corais se dividem em duas subclasses: Hexacorallia, que compreende anêmonas do mar e corais duros construtores de recifes (ordem Scleractinia) e a Octocorallia, que compreende as ordens Helioporacea (comumente referida como "corais azuis"), Pennatulacea (chamada "penas do mar"), e Alcyonaceae (incluindo organismos popularmente chamados de "leques do mar", "chicotes do mar" e "gorgônias"). Organismos das duas últimas ordens também são conhecidos como "corais moles" (DALY et. al., 2007). Os octocorais, possuem uma simetria óctupla de seus pólipos, estando presentes em todos os oceanos do mundo, desde o ártico até as águas tropicais, de recifes rasos até as profundezas marítimas. Participando como formadores dos ecossistemas, os octocorais podem contribuir em até 95% da biomassa total, através da determinação do fluxo de carbono aumentam a biodiversidade bêntica (CURDIA

et. al., 2013).

Os recifes de coral são considerados um dos ecossistemas com maior biodiversidade, porém também os mais ameaçados. A drástica diminuição dos ecossistemas de recife, estão atribuídos à diversos distúrbios, como mudanças climáticas, os impactos humanos como a pesca excessiva, poluição, sedimentação e doenças emergentes nos corais. Estes fatores reduziram muito as populações de corais, causando com isso uma diminuição da cobertura e na composição das espécies de corais ocasionando a perda da biodiversidade dos ecossistemas. Em relação a composição da cobertura, os corais são os mais determinantes em relação a complexidade das estruturas nos habitats dos recifes (RICHARDSON; GRAHAM; HOEY, 2020).

O Brasil possui a sua faixa de recifes de corais localizada no litoral nordeste, estendendo-se desde o Maranhão até o sul da Bahia, podendo também ser encontrados nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (AMARAL et. al., 2008). Sendo o Banco de Abrolhos considerado um dos maiores e mais ricos recifes de coral do Atlântico Sul (ZILBERBERG et. al., 2016). A distribuição dos organismos marinhos, incluindo os corais, é determinada por interações de fatores físicos, químicos e biológicos. No sudoeste do Atlântico existem, ao longo de 3.000 km, comunidades de recifes costeiros na costa brasileira (MOURA et. al., 2016), no qual apresentam um alto endemismo de espécies construtoras de recifes (ROGERS, 2014).

Dentre as espécies endêmicas encontradas nesses ecossistemas encontram-se corais-pétreos zooxantelados, pertencentes à Ordem Scleractinia, corais negros da Ordem Antipatharia, Corais-de-fogo ou hidrocorais, pertencentes às Famílias *Milleporidae* (*M. braziliensis* e *M. nitida*) e *Stylasteridae* e Octocorais da Subclasse Octocorallia (ZILBERBERG et. al., 2014).

O gênero *Millepora* abriga uma grande diversidade de espécies que ocorrem em mares tropicais por todo o planeta, entretanto, no Brasil, encontram-se apenas quatro espécies desse grupo (*Millepora braziliensis*, *Millepora nitida*, *Millepora laboreli* e *Millepora alcicornis* (Fig.1) (AMARAL et. al., 2008). Este gênero do filo Cnidaria; classe Hydrozoa representam os organismos formadores de recifes mais abundantes em ecossistemas de recifes de coral (LEWIS, 2006).

O gênero *Millepora* caracteriza-se por possuir células urticantes. Também conhecidos como “corais-de-fogo”, esses invertebrados podem provocar graves queimaduras ao serem tocados devido à presença de nematócitos (GARCIA, 2006). Os nematócitos estão dentro de uma cápsula, que são os cnidócitos. O veneno presente nos nematócitos, que se encontra dentro do cnidócito, são injetados através de um túbulo, nematocistos, por estímulos físico ou químico (GARCÍA-ARREDONDO, 2012). As espécies de *Millepora* podem provocar lesões

semelhantes a queimaduras ao perfurar a pele e causar irritação, queimação ou dor aguda, dermatite eritematosa e edematosa, prurido, urticária e necrose. Também são citados sintomas sistêmicos como mal-estar, náusea, vômito, dor abdominal, espasmo muscular, diarreia, dificuldade respiratória, taquicardia, hipotensão e febre (GARCÍA-ARREDONDO, 2012; MOATS, 1992).

Figura. 1 – Coral de fogo da espécie *Millepora alcicornis*.



Fonte: <http://www.thecephalopodpage.org/MarineInvertebrateZoology/Milleporaalcicornis.html>

Dentre as espécies endêmicas, quatro pertencem ao gênero *Mussismilia*, comumente conhecido como coral-cérebro, *Mussismilia braziliensis*, *Mussismilia harttii*, *Mussismilia hispida* e *Mussismilia leptophylla* (BUDD et. al., 2012; CASTRO; PIRES, 2001; CASTRO; MEDEIROS; LOIOLA, 2010). *M. harttii* (Fig.2) é considerada uma das principais construtoras de recifes do Brasil (PIRES et. al., 1999). Essa espécie apresenta morfologia em forma laxa, confertifólia ou intermediária (LABOREL, 1967).

Figura. 2 – Imagem Coral *Mussismilia harttii*.



Fonte: Projeto Coral Vivo

Essa espécie além de ser uma importante construtora recifal é a segunda maior em termos de distribuição no Brasil entre as espécies do gênero *Mussismilia*, ocorrendo desde o Estado do Ceará até o Espírito Santo, incluindo áreas oceânicas (Fernando de Noronha e Atol das Rocas) (LABOREL, 1967, 1969), mas normalmente encontrada em profundidades de 2 e 6m, podendo eventualmente ser encontrada até os 55m (CASTRO et. al., 1986). Suggett e colaboradores (2012) descrevem que em ambientes de baixa turbidez a espécie *M. harttii* representa cerca de 70% da cobertura total de corais sendo esse valor reduzido entre 40 e 50% em ambientes de alta turbidez.

O gênero *Mussismilia* possui raras avaliações moleculares, mas a distinção entre as espécies já está bem estabelecida, permitindo assim uma mais rápida identificação em campo (ROGERS et. al., 2014). Esse gênero possui, pelo menos, duas espécies em risco de extinção: *M. braziliensis* e *M. harttii* (PIRES, et. al., 2018). Sendo o primeiro restrito aos recifes rasos do Estado da Bahia e recifes de Abrolhos, enquanto o segundo é encontrado desde o litoral do Ceará até o Espírito Santo. A espécie *Mussismilia harttii* é o principal coral formador de recifes no nordeste do Brasil (MOURA et. al., 2016), geralmente encontrado em profundidades entre 2 a 6m, com registros isolados de até 80m (HETZEL; CASTRO, 1994). É importante avaliar as populações de *M. harttii* e indicar quais fatores estressantes podem estar levando à redução e/ou extinção local das populações desta espécie. Atualmente, *M. harttii* possui as menores porcentagens de cobertura entre seus congêneres (KIKUCHI et. al., 2008) e populações em severo declínio (PIRES, et. al., 2018).

Phyllogorgia dilatata (Fig.3) é uma espécie com estrutura colonial, eixos que se anastomosam, formando um retículo, e cenênquima preenchendo os espaços entre eixos, de modo a formar uma folha contínua, onde estão os pólipos. Existem colônias aberrantes onde não ocorre anastomose ou formação de folha. Entretanto, essas colônias anormais podem ser distinguidas de outras espécies com esclerito tipo escafóides pela distribuição de pólipos ao redor de todo o ramo e pelo cenênquima mais grosso (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

A continuidade da folha pode estar relacionada às características ambientais, como intensidade, direção e uniformidade das correntes. A colônia pode atingir mais de 50cm de altura e é encontrada no infralitoral, frequente em ambientes e recifes coralíneos de águas rasas, com registro mais profundo de 28m ao largo de Rocas. Esta espécie endêmica está distribuída pelo litoral brasileiro e ilhas oceânicas nos seguintes estados: MA (inclui parcel do Manuel Luiz), CE, RN (inclui atol das Rocas), PE (inclui Fernando de Noronha), BA (inclui o banco dos Abrolhos), ES (inclui a ilha da Trindade), RJ (limite sul de distribuição conhecido

em Arraial do Cabo). Também esta espécie costuma ser usada como objeto ornamental, tendo muitas vezes o cenênquima removido e seu eixo usado em aquários ou outros arranjos decorativos, esta espécie também já foi objeto de estudos farmacológicos. (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

Figura. 3 – Imagem da espécie de estrutura colonial do coral *Phyllogorgia dilatata*.



Fonte: Projeto Coral Vivo.

1.2. Moléculas antimicrobianas extraídas do ecossistema marinho

Há muito tempo que o homem utiliza da natureza como fonte de aquisição de medicamentos. Existem uma imensa diversidade química entre as diferentes espécies que utilizam esses mecanismos como defesa contra predadores, dentre eles as plantas, animais e microrganismos (SAHM, 2014).

Bactérias resistentes a grande parte dos antibióticos e sensíveis aos mais avançados antibióticos, é um problema de saúde pública. Pesquisas atuais e direcionadas aos microrganismos marinhos apresentam um grande potencial para novos compostos com capacidade de atingir de forma segura e eficaz espécies resistentes. As bactérias marinhas e terrestres possuem várias semelhanças, porém as adaptações exigidas pelos organismos para sobreviver em um ambiente marinho exigiram mudanças genótípicas e assim, novos compostos para auxiliar em sua sobrevivência. A busca de novos compostos nos ecossistemas marinhos é um processo demorado e trabalhoso, porém muitos que foram descobertos prometem combater doenças como câncer, Alzheimer e osteoporose (BETZ; DER MARDEROSIAN, 1991).

Em áreas profundas ou ecossistemas marinhos, como os recifes de coral, acredita-se que a diversidade biológica seja muito ampla. Muitos desses organismos marinhos necessitam de

mecanismos químicos de defesa por possuírem corpo mole e vida sedentária. Por esse motivo esses organismos desenvolveram a habilidade de sintetizar compostos tóxicos. Assim como, produtos naturais liberados na água são rapidamente diluídos e, por isso, precisam ser altamente potentes para exercer algum efeito. Pela grande biodiversidade do ambiente marinho ainda desconhecido, pesquisadores seguem em busca do potencial farmacológico dos metabólitos secundários originários dos organismos marinhos (SAHM, 2014).

A maioria dos produtos naturais marinhos, conhecidos, foi isolada de invertebrados de ambientes marinho. Representantes dos filos Porífera (esponjas), e Cnidária (águas-vivas, anêmonas-do-mar e corais), tem sido reconhecidos como os grupos de invertebrados marinhos quimicamente mais fecundos, isto se deve, possivelmente, pela ampla ocorrência e fácil acesso a estes animais, que são habitantes comuns de recifes de coral (SAHM, 2014).

Em relação a diversidade de produtos naturais, observa-se que os organismos marinhos possuem uma vasta diversidade incomum e complexa. Ao passar do tempo são descobertos cada vez mais estruturas químicas provenientes de biomas marinhos. Em relação à quantidade pode observar os corais como uma das maiores fontes de produtos naturais retirados de animais marinhos, ficando atrás somente das esponjas. Uma grande variedade de novos bioativos terpenóides particularmente esquí e diterpenóides, mas também esteróides, alcalóides e policetídeos incomuns foram retirados de corais da subclasse Octocorallia. Dos corais *Antillogorgia elisabethae* foram encontrados compostos bioativos naturais que possuem potentes propriedades antibacterianas, antiinflamatórias, anticâncer, antivirais, antimaláricas, neuroprotetora, antituberculose e aceleradores de cicatrização (RAIMUNDO; SILVA; COSTA; KELLER-COSTA, 2018).

Trindade et. al. (2021) descrevem que os microrganismos possuem diversas maneiras de se proteger de seus inimigos e sobreviver em ambientes adversos. Microrganismos não móveis, especialmente os que habitam ambientes marinhos e o solo, são conhecidos pela sua grande capacidade de produzir produtos químicos. Os microrganismos são geralmente isolados da água do mar, de sedimentos, algas, peixes e principalmente de invertebrados marinhos como esponjas, moluscos, tunicados, cnidários e crustáceos. Pressão, salinidade, temperatura, pH, fatores bióticos e abióticos presente no ecossistema marinho, refletem nas rotas metabólicas desses seres vivos para que possam adaptar-se ao habitat em que vivem, assim como a competição por espaço, predação, incrustação da superfície e reprodução, também refletem na variabilidade genética (CONTI; GUIMARAES; PUPO, 2012).

O número de bactérias que residem nos invertebrados marinhos pode ser tão variado e

numerosos que podem constituir, por exemplo, até 60% da biomassa total de esponjas (OLSON; MCCARTHY; 2005). Essas bactérias possuem papel essencial nas funções biológicas de seus hospedeiros, atuando na nutrição, saúde e substâncias de defesa. O papel destes microrganismos nos ecossistemas de recifes e corais ainda não está clara, sendo que esses microrganismos podem atuar como saprofitos ou patógenos, ou ainda desenvolver outras funções importantes no ecossistema (SHNIT-ORLAND & KUSHMARO; 2009).

Em relações simbióticas com corais a microbiota pode contribuir para obtenção de nutrientes como o nitrogênio e fósforo ou ainda desenvolver funções importantes de proteção contra patógenos. As bactérias marinhas são seres na sua maioria Gram-negativa, flagelada e não esporuladas, ocorrendo Gram-positivas, com formas variadas como bacilos, cocos, vibriões e espirilos (MUNN, 2004). As Gram-negativas são representadas principalmente pelos gêneros: *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*, *Shewanella* e *Vibrio* (GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007). Na biodiversidade de Gram-positivas, os filos Actinobacteria (*Actinomicetos*) e Firmicutes (gêneros *Bacillus* e *Clostridium*) são os mais encontrados. Conhecidos como saprófitos do solo, *Bacillus* e *Clostridium* são componentes de sedimentos marinhos (RODRIGUES, 2008).

Estudos da investigação da microbiologia no coral focada na camada de muco da sua estrutura demonstraram que esta camada suporta uma comunidade de bactérias benéficas, diversas e abundantes incluindo fixadoras de azoto e decompositores de quitina. Já os esqueletos de coral são estruturas porosas habitadas por uma variedade de bactérias (ROSENBERG *et. al.*, 2007).

Certos produtos isolados de invertebrados marinhos demonstram grande semelhança estrutural com produtos naturais bacterianos, sugerindo que os microrganismos estariam, pelo menos envolvidos na sua biossíntese ou são de fato a verdadeira fonte desses metabólitos. Esta teoria simbiótica tem sido alvo de estudos de pesquisadores, uma vez que a produção em maior escala de eventuais produtos por fermentação microbiana é mais factível e de menor impacto ambiental que o isolamento de produtos naturais dos invertebrados marinhos (CONTI; GUIMARAES; PUPO, 2012).

A complexidade das associações entre os organismos marinhos pode dificultar a definição com relação a origem biossintética de muitos produtos naturais. As esponjas, por exemplo, têm contribuição para o microambiente podendo ser residência de uma grande diversidade microbiana, contemplando fungos, arqueobactérias, bactérias heterotróficas, algas, cianobactérias, dentre outros. Podendo estar localizados intra e/ou extracelularmente na esponja hospedeira. Estima-se que funções como absorção de nutrientes, regulação

metabólica, mecanismos de defesa e fixação de nitrogênio podem estar relacionadas às interações entre esponjas e microrganismos. Como consequência novos produtos naturais bioativos que são produzidos por microrganismos marinhos têm sido frequentemente descritos na literatura (CONTI; GUIMARAES; PUPO, 2012).

O metabolismo pode ser definido como o total de reações químicas que ocorrem dentro de uma célula viva. O metabolismo celular é coordenado pela ação de enzimas que estabelecem uma sequência de matéria e energia no decorrer de reações químicas ordenadas e sequenciadas (vias metabólicas) tendo como objetivo degradar, produzir ou modificar compostos químicos. O metabolismo é a junção do anabolismo e do catabolismo. No anabolismo, moléculas de estruturas simples, que são denominadas subunidades monoméricas estruturais se juntam para formar moléculas maiores e mais complexas, os polímeros ou macromoléculas, com auxílio de enzimas biossintéticas, com junção de energia útil (energia livre de Gibbs) nas moléculas formadas. Já o catabolismo consiste em reações coordenadas por enzimas que promovam a degradação de moléculas com estruturas mais complexas, tornando-se moléculas menores, onde liberam energia útil para o sistema celular. Formado pela integração dessas duas classes de vias metabólicas, o metabolismo visa suprir as necessidades primordiais das células em relação a matéria e energia, como moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), moléculas com alto poder redutor (coenzimas reduzidas) e para viabilizar a biossíntese de macromoléculas como polissacarídeos, lipídeos de cadeia longa e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2014).

Crescimento de organismos uni e pluricelulares são dependentes da biossíntese e do consumo de metabólitos essenciais. Esses metabólitos são sintetizados por dois subconjuntos de vias, o metabolismo primário, que produz os metabólitos primários, e o metabolismo secundário, que produz os metabólitos secundários (SEYEDSAYAMDOST, 2019).

Metabólitos primários são moléculas essenciais à vida dos organismos. Os organismos unicelulares, como as bactérias, são conjuntos de moléculas usadas para obter energia e construir compostos precursores, cofatores e polímeros biológicos permitindo assim o crescimento e proliferação deles. As produções desses compostos ocorrem em maior número na fase exponencial do crescimento bacteriano e, geralmente são caracterizados por possuir uma carga, o que pode dificultar sua passagem pela membrana e assim garantindo a sua permanência dentro das células (HEINEMANN; SAUER, 2010). O metabolismo primário é necessário para o crescimento e reprodução celular. Sendo assim, todas as suas vias metabólicas estarão sempre ativas e suas enzimas expressas em altas concentrações na célula.

Já os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular e se localizam na parte extracelular, onde desempenham importantes papéis nas interações entre o microrganismo e o ambiente em que se encontram. Essas moléculas podem ser produzidas ao longo de todas as fases de vida da bactéria, porém é mais comum observar uma maior produção no final da fase exponencial e na fase estacionária (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996).

Os metabólitos secundários são compostos com predominância extracelular, onde, são caracterizados por serem moléculas não carregadas e apolares, onde, após serem produzidas pela célula, precisam atravessar a membrana plasmática bacteriana e, por vezes, também a do organismo alvo, podendo ser sintetizados via ribossomal ou não ribossomal. Mesmo não sendo essenciais para a vida, esses metabólitos secundários podem conferir aos organismos certas vantagens evolutivas, como a participação no sistema imune inato e melhorando a tolerância ao estresse ambiental (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996; METLEN; ASCHEHOUG; CALLAWAY, 2009; WANG; LU, 2017).

Como possuem uma grande diversidade em sua estrutura, esses compostos também podem apresentar uma grande variedade de atividades biológicas. Os metabólitos secundários podem ser encontrados em toda forma de vida, uma vez que possuem importantes funções ecológicas. Dessa maneira, esses compostos estão sendo explorados pela medicina como agentes anti-infecciosos, anticancerígenos e antibióticos (OSBOURN, 2010) e em várias outras aplicações, como agente antiincrustante na indústria naval (ALMEIDA et. al., 2014) e bioconservantes na indústria alimentícia (REBELLO; GASPARELLO, 2010). Esses metabólitos secundários microbianos incluem antibióticos, pigmentos, toxinas, efetores da competição ecológica e simbiose, feromônios, inibidores de enzimas, agentes imunomoduladores, pesticidas, agentes antitumorais e promotores de crescimento de animais e plantas (DEMAIN, 1998).

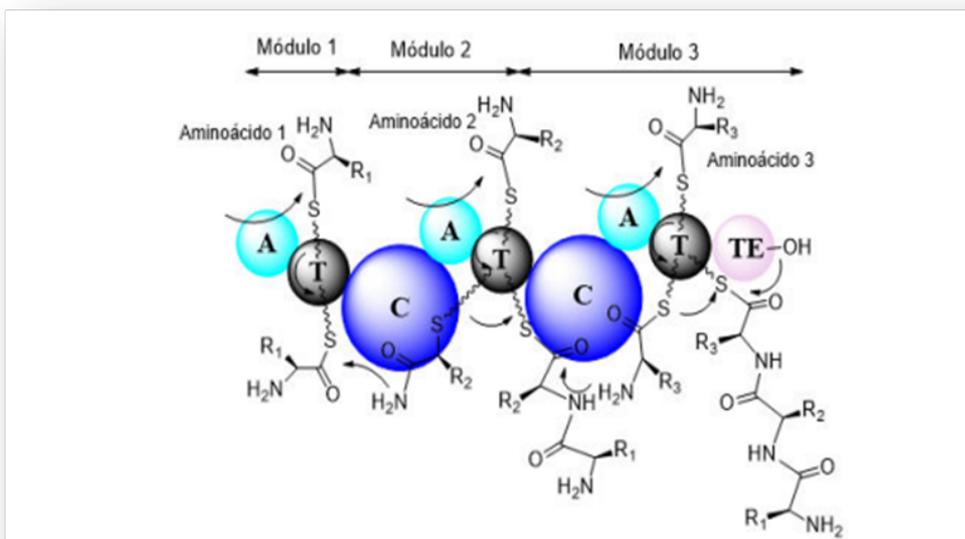
A classificação desses metabólitos secundários é dada por meio de sua origem biossintética, onde os metabólitos secundários podem ser citados como policetídeos e peptídeos não ribossomais (O'CONNOR, 2015).

Os PKSs (Policetídeos Sintase) e os sintetizadores de peptídeos não ribossômicos (NRPSs) constituem uma classe de proteínas multifuncionais que possuem enzimas complexas com mecanismos de grande utilidade comercial, pois essas enzimas criam uma infinidade de metabólitos secundários, muitos poderiam se tornar importantes drogas (XINGHAI; et. al., 2021).

As NRPS (Non-ribosomal peptides synthetase) (Fig. 14) formam um eficiente maquinário

para a biossíntese de moléculas constituídas por módulos diferentes. Onde cada módulo é responsável pela incorporação de um único aminoácido. Cada módulo de NRPS se subdivide em vários domínios que catalisam reações específicas, permitindo o alongamento da cadeia e a formação dos precursores de metabólitos (LI; WEISSMAN; MULLER, 2010 apud GONZÁLEZ; SIGRIST; PAULO, 2016). O módulo de iniciação, primeiro módulo da NRPS, é formado por um domínio de adenilação (A) e um domínio de tioação (T), conhecido também como proteína carreadora de peptídeo (PCP). Em seguida vêm os módulos de alongação da cadeia que contém, de forma obrigatória, um domínio de condensação (C) seguido de um domínio de adenilação e outro de tioação (Figura 4). Fazendo parte destes módulos de alongação, podem-se encontrar enzimas acessórias como as epimerases (E), metiltransferases (MT) e ciclases (Cy). O módulo final, apresenta um domínio de tioesterase (TE) com função de catalisar a liberação do produto final, onde ainda pode sofrer modificações posteriores desencadeada pelas enzimas pós-NRPS, como as glicosiltransferases, que catalisam reações de glicosilação e possuem particular relevância nas últimas etapas da biossíntese de antibióticos glicopeptídicos, como a vancomicina (LI; WEISSMAN; MULLER, 2010 apud GONZÁLEZ; SIGRIST; PAULO, 2016). Desta forma este complexo enzimático pode estar envolvido na produção de inúmeras moléculas como a ciclosporina A, que é produzida por *Tolypocladium niveum*, possuindo 1,6 MDa de tamanho (WEBER et. al., 1994 apud GONZÁLEZ; SIGRIST; PAULO, 2016).

Figura 4 - Representação da biossíntese de peptídeos não ribossomais nas NRPS



Fonte: (GONZÁLEZ; SIGRIST; PAULO, 2016)

As enzimas produzidas pelos PKSs representam algumas proteínas conhecidas, e,

consequentemente o seu caráter multifuncional, onde, uma única proteína pode ser capaz de catalisar dezenas de reações bioquímicas discretas. Como a rapamicina PKS e o Ciclosporina NRPS que catalisam 51 e 40 passos durante a montagem de seus respectivos produtos. Essa evolução favoreceu o desenvolvimento dos PKSs modulares multifuncionais, pois a junção desses intermediários às subunidades PKS poderá facilitar a transferência intramolecular de substratos de um domínio para o próximo ("canalização de substratos") na sequência de reações bioquímicas (MANAR; et. al., 2018).

Estas moléculas são produzidas por clusters de genes. Clusters de genes é um grupo de dois ou mais genes encontrados no DNA de um organismo que codificam polipeptídeos semelhantes, ou proteínas, que coletivamente compartilham uma função generalizada e geralmente estão localizados dentro de alguns milhares de pares de bases um do outro (HUTCHINSON, 1999).

Metabólitos descobertos recentemente em moléculas oriundas de organismos marinhos, com características terapêuticas, demonstram fontes de bioativos desses seres, com estruturas e conformações próprias, relativamente diferentes daquelas encontradas em moléculas de função similar encontradas em organismos terrestres.

2. JUSTIFICATIVA

O ambiente marinho cobre cerca de 70% do planeta terra, é uma fonte rica em diversidade biológica e química. O Brasil é o país com maior diversidade biológica do mundo incluindo ilhas oceânicas que possuem grande biodiversidade com muitas espécies endêmicas (MOHR et. al., 2009). A presente proposta visou realizar a bioprospecção de metabólitos, macromoléculas e peptídeos antimicrobianos (PAMs), produzidos pela microbiota cultivável relacionados às espécies de corais *Mussismillia harttii*, *Millepora alcicornis* e *Phyllogorgia dilatata*, no intuito de que são produzidos metabólitos secundários de grande interesse.

Apesar de muitos microrganismos relacionados a corais já terem sido descritos, muitos ainda continuam desconhecidos. Neste contexto, este trabalho é importante não somente no intuito de ampliar a exploração e investigação nas descobertas de novos fármacos, mas também nos estudos de ecologia e biodiversidade marinha e na análise desse ecossistema ainda pouco explorado. Também através dos resultados obtidos aqui podemos fazer comparações com outros trabalhos já em desenvolvimento, que buscam atividades em isolados de corais de *M. alcicornis* e *P. dilatata* provenientes de Búzios no Rio de Janeiro (MACEDO, 2020). Ainda existem muitos organismos marinhos por serem descobertos e uma grande quantidade de substâncias químicas a serem exploradas, além da contribuição promissora na produção de bioprodutos para consumo humano e veterinário, com a descoberta de biomoléculas com grande potencial farmacológico.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem por objetivo o estudo da diversidade microbiana associada a cnidários das espécies *Millepora alcicornis*, *Mussismilia harttii* e *Phyllogorgia dilatata* coletado no parque Municipal Marinho de Recife de Fora (Arraial d'Ajuda-BA) e sua utilização em bioprospeção de moléculas de interesse biotecnológico.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o isolamento de microrganismos utilizando dois meios de cultivo diferentes relacionadas aos corais: *Millepora alcicornis*, *Mussismilia harttii* e *Phyllogorgia dilatata*;
- Criar um banco na forma de uma coleção de cultura dos microrganismos isolados e criopreservá-los;
- Identificar os microrganismos isolados utilizando métodos moleculares, baseados na filogenia do gene 16rRNA;
- Investigar a produção de compostos antimicrobianos pelos isolados bacterianos das três espécies de corais, contra bactérias Gram positiva e Gram negativa de importância clínica;
- Verificar a presença de genes de lipopeptídeos relacionados à atividade antimicrobiana através de primers específicos, utilizando a técnica de PCR.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das amostras de corais

O material utilizado neste estudo foi coletado no parque Municipal Marinho de Recife de Fora (Arraial d'Ajuda-BA). Este parque foi criado por lei municipal em 1997 e, desde então, é considerado área de preservação permanente. A diversidade biológica é similar à Abrolhos. Os corais das espécies *Millepora alcicornis*, *Mussismilia harttii* e *Phyllogorgia dilatata*, nos quais foram identificados pelo Dr. Clovis Barreto e Castro pesquisador da Rede de Pesquisas Coral Vivo, foram coletados entre os dias 11 a 13 de novembro de 2019. As espécies foram coletadas na área do Parque que está situado a cinco milhas náuticas, a nordeste da Cidade de Porto Seguro-BA, localizado entre 16°23'-16°25'S e 38°58'-39°00'W e ocupando uma área de 17,5Km². A coleta, realizada pelos pesquisadores do grupo projeto Coral Vivo, seguiu a distribuição da ocorrência de cada espécie em áreas de até 6m de profundidade perfazendo 3 réplicas de cada espécie. Após a coleta dos materiais, os espécimes foram colocados em tanques de água com aeração até o momento do processamento do material. O material armazenado em Tubos para centrífuga foram preservados a temperatura de 4°C, durante o transporte, até o laboratório da Universidade. No laboratório, o processamento das amostras foi realizado, primeiramente, com a limpeza das amostras dos cnidários com 10mL da solução salina estéril (concentração 3% de NaCl) seguido da remoção de fragmentos de cada réplica biológica onde, separadamente, cada fragmento foi macerado juntamente com 5mL da mesma solução salina (Fig.5 A, B, C). Também foram coletadas amostras de água que circundavam os corais. Este material também foi utilizado para o plaqueamento e comparação de microbiota cultivável presente nos corais.

Uma parte das amostras de cada réplica biológica foi armazenada em freezer a -80°C para posterior análise do metagenoma da água e coral.

4.2. Obtenção dos isolados bacterianos

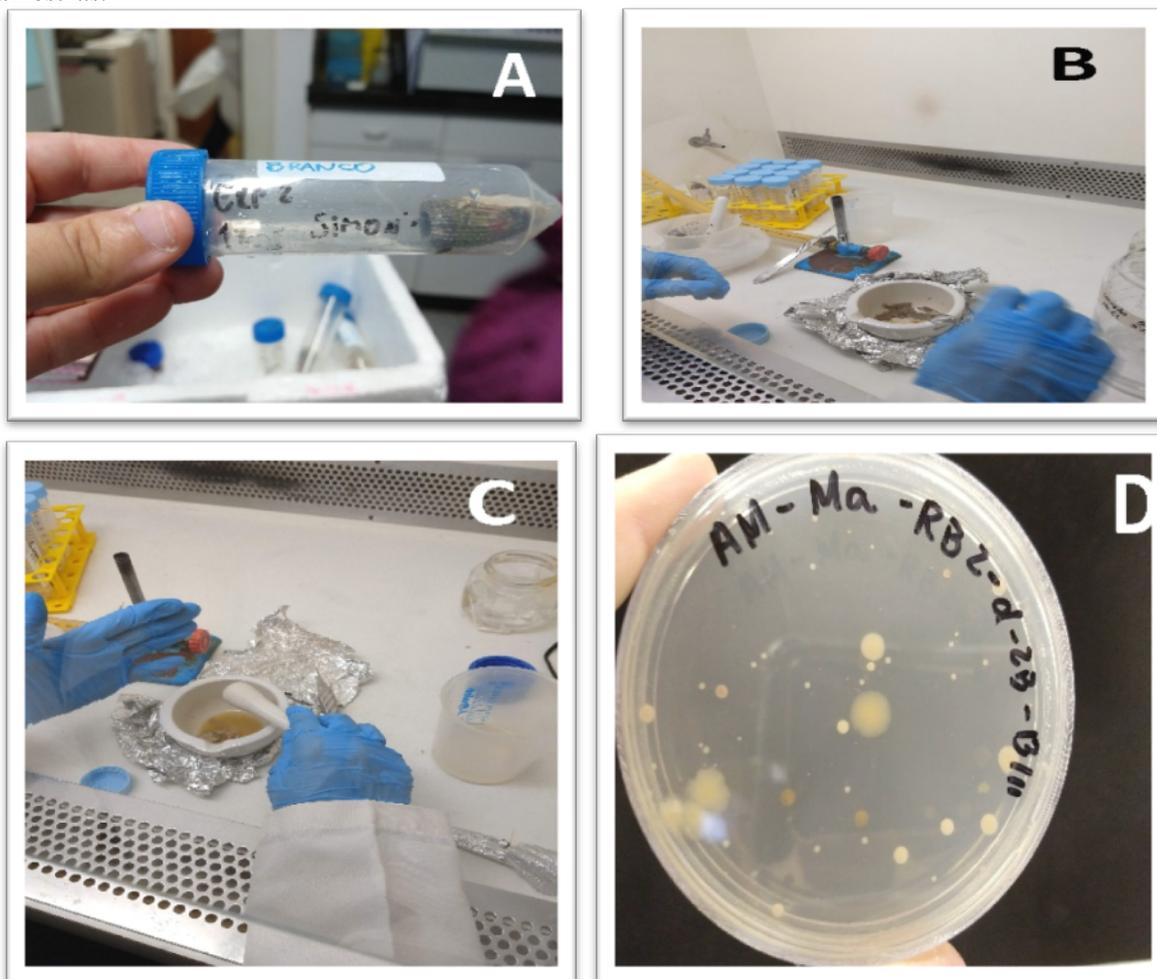
Com o processamento dos fragmentos dos corais, foi obtido o inóculo para semear nos meios de cultura utilizados (Fig. 5 D). Com finalidade de realizar uma comparação entre os isolados microbianos crescidos a partir dos fragmentos dos corais, também foram realizados plaqueamento nos mesmos meios de cultura das águas que foram coletadas juntamente com os corais.

A partir do extrato na maceração de cada réplica biológica dos corais foram realizadas diluições seriadas resultando em diluições de 10⁻¹ a 10⁻³ em meio de cultura sólido ágar marinho (peptona 5g.L⁻¹, extrato de levedura 1g.L⁻¹, cloreto de sódio 15g.L⁻¹, cloreto férrico

0,0812g.L⁻¹, citrato de sódio 1g.L⁻¹ e ágar 20g.L⁻¹) contendo 1µg·mL⁻¹ de Anfotericina B. As amostras também foram plaqueadas em Meio SWA (NaCl 24,6g/L; KCl 0,67g/L; CaCl₂·2 H₂O 1,36g/L; MgSO₄·7 H₂O 6,29g/L; MgCl₂·6 H₂O 4,66g/L; NaHCO₃ 0,18g/L; Glicose 1g/L; Extrato de Levedura 1g/L; Ágar 15g/L; pH final (25 °C) 7,5 ± 0,5).

Além dos corais, também foram realizadas, diluições de 10⁻¹ a 10⁻³ da água que acompanhava cada uma das 3 espécies de coral, *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*. Todas as diluições foram plaqueada em 3 placas de Petri contendo os dois meios de cultivo sólido: ágar marinho e ágar SWA.

Figura 5 – Procedimentos realizados para o Cultivo e Obtenção das Culturas das três espécies de Coral: *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*. (A) Amostra do Coral coletado; (B) Processo de Fragmentação do Coral; (C) Maceração do Coral para semear; (D) Contagem das culturas crescidas nos diferentes meios e amostras.



Fonte: foto da autora

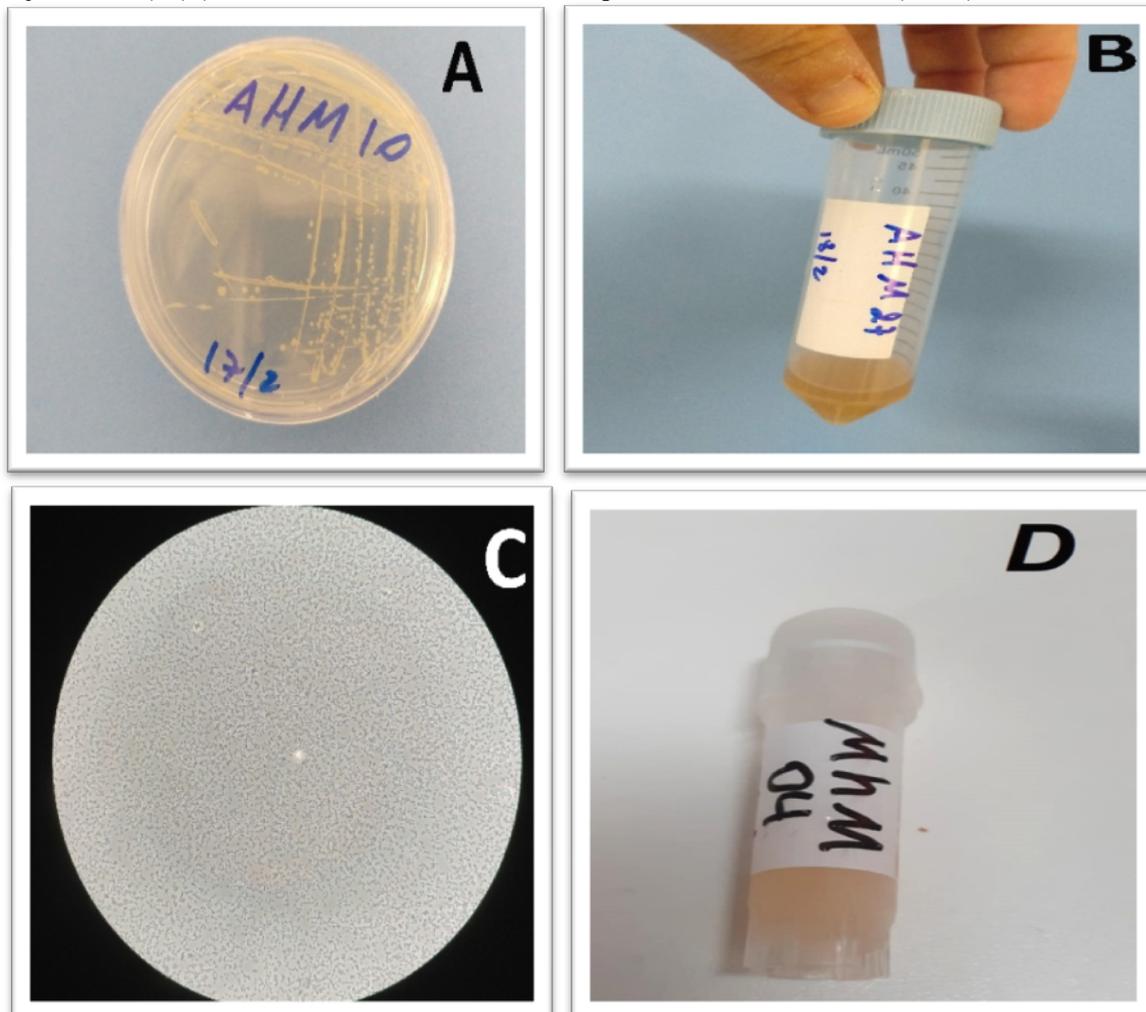
4.3. Obtenção e armazenamento das colônias puras

Posterior ao crescimento bacteriano proveniente do inóculo das amostras de corais nos dois procedimentos, água e coral, e nos 2 meios de cultivo realizou-se a seleção e caracterização das colônias obtidas em cada placa. Desta forma, de cada uma das placas com diferentes concentrações de inóculo, foram selecionadas três colônias de cada morfotipo diferente encontrado.

Um novo plaqueamento foi realizado, onde amostras das colônias obtidas foram transferidas para o meio sólido ágar marinho (Merck) ou meio sólido SWA (Caldo de Sais de Água do Mar Artificial), pelo processo de esgotamento, no intuito de obter culturas puras das diferentes bactérias coletadas (Fig. 6A).

Uma colônia pura de cada isolado foi transferida para um Tubo para centrifuga, de 50mL, contendo 5mL do mesmo meio líquido onde a cultura se encontrava. Estes tubos foram levados a um agitador a 28°C com rotação de 4G por 24 horas (Fig. 6B). Após decorrido esse tempo, uma pequena aliquota (2 μ L) foi aplicada em uma lâmina, a lamínula inserida logo em cima e visualizado ao microscópio para a primeira caracterização morfológica do isolado (Fig. 6C). Após essa etapa o Tubo para centrifuga contendo o isolado foi centrifugado à 7.168G por 10 minutos, o pellet formado foi ressuspendido em 430 μ L de meio no qual se encontrava (Marinho ou SWA) e transferido para um criotubo contendo 170 μ L de glicerol (concentração final 20% v/v), sendo em seguida armazenada em freezer a temperatura de -80°C (Fig. 6D).

Figura 6 – Etapas dos processos para a Obtenção e o armazenamento da cultura pura. (A) Obtenção da cultura pura a partir do semeado de esgotamento de cada isolado; (B) Cultivo da cultura isolada em meio Líquido; (C) Observação do isolado crescido a fim de verificar morfologia do isolado (Microscopia Óptica - Objetiva 100x); (D) Isolado armazenado em criotubo para armazenamento em (-80°C).



Fonte: foto da autora

As amostras isoladas e armazenadas em criotubos foram identificadas utilizando uma nomenclatura relacionada ao tipo e origem da amostra. A Tabela 1 apresenta a descrição das siglas que foram utilizadas nos isolados, seguindo a sua origem em relação a procedência, se provinham da água coletada juntamente com o coral (siglas iniciadas em A), ou do próprio coral macerado; também a qual espécie pertence e em qual meio foi cultivado (Siglas final M – meio Marinho, final A – meio SWA). A partir desses dados foi padronizada a identificação dos isolados encontrados.

Tabela 1 - Descrição das Siglas determinada para os Isolados obtidos das espécies de Coral - *M. alcicornis*; *M. harttii* e *P. dilatata*.

Sigla	Origem	Espécie	Meio
AHA	Água	<i>Mussismilia harttii</i>	SWA
AHM	Água	<i>Mussismilia harttii</i>	Marinho
MHA	Coral	<i>Mussismilia harttii</i>	SWA
MHM	Coral	<i>Mussismilia harttii</i>	Marinho
AMA	Água	<i>Millepora alcicornis</i>	SWA
AMM	Água	<i>Millepora alcicornis</i>	Marinho
MaM	Coral	<i>Millepora alcicornis</i>	Marinho
MaA	Coral	<i>Millepora alcicornis</i>	SWA
APA	Água	<i>Phyllogorgia dilatata</i>	SWA
APM	Água	<i>Phyllogorgia dilatata</i>	Marinho
PdM	Coral	<i>Phyllogorgia dilatata</i>	Marinho
PdA	Coral	<i>Phyllogorgia dilatata</i>	SWA

4.4. Caracterização morfológica dos isolados

Após a ação de seleção, isolamento e o armazenamento, foi realizada a caracterização morfológica da colônia e das células bacterianas de cada isolado obtido dos inóculos bacterianos associados as espécies de corais. Após o crescimento e obtenção de colônias isoladas, foi realizada a caracterização da colônia, observando aspectos como presença ou ausência de brilho, presença ou ausência de halo ao redor da colônia, formato e tamanho. Feita a caracterização morfológica da colônia, realizou-se então a caracterização celular de cada isolados por meio de observação ao microscópio óptico com aumento de 1000X (Marca: ZEISS AX10) (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

Os isolados foram caracterizados tendo as informações associadas ao registro de siglas e número a eles atribuídos no momento do isolamento inicial. Juntamente com a caracterização morfológica, também foi observado o formato das células e a presença de esporos sendo

observado seu formato, podendo estes serem classificados como bacilos, cocos ou vibrio.

4.5. Avaliação da atividade Antimicrobiana

Foram feitos testes de atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (cepa ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC25923) para verificar a presença de atividade antimicrobiana por meio do método qualitativo de difusão em meio. Inicialmente para crescimento uniforme dos microrganismos acondicionados a -80C foi realizado um pré-inóculo das colônias, onde cada uma das colônias foi crescida, em placas com meio ágar Mueller Hinton por 12 horas.

Os isolados a serem avaliados foram semados em placa em cinco diferentes meios: Ágar LB, Ágar Nutriente, Ágar SWA, Ágar Marinho e TSA. As placas foram levadas a estufa 28°C por 16 horas. Após esse período 1 colônia isolada foi inoculada em um Tubo para centrífuga, de 50mL, contendo 5mL para cada meio, dos meios testados. Os isolados foram incubados em shaker a 28°C e rotação de 4G por 72 horas. Como controle negativo (-) do teste foi utilizado um tubo falcon com 5mL do meio sem inóculo para verificar se não haveria contaminação do meio e utilizá-lo.

Ao mesmo tempo, foi realizado um pré-inóculo dos patógenos, onde duas colônias da cepa de *E. coli* ou *S. aureus* foi adicionado em 5mL, em um Tubo para centrífuga de 50mL, de meio caldo Mueller Hinton (Sua composição consiste em (g/L): extrato de carne (2,00g); hidrolisado ácido de caseína (17,50g); amido (1,50g); ágar (17,00g). O pH foi ajustado para $7,3 \pm 0,2$ em temperatura ambiente (25°C). O tubo foi crescido, por 24 horas a 37°C, a 4G. Deste inóculo, foi retirado uma alíquota (50µL) e inoculado em 4.950µL de meio Mueller Hinton novo e novamente incubado a 37°C, até a obtenção de uma OD entre 0,6 e 0,7. Despositou-se então 200µL, sobre cada placa de meio ágar Mueller Hinton, de *E. coli* ou *S. aureus* (inóculo), espalhando nas placas com auxílio de uma alça de Drigalsk, com o objetivo de deixar a placa totalmente forrada com a cultura utilizada, formação de tapete.

Após a secagem do inóculo na placa, foram adicionados 10µL dos isolados distribuídos de forma equidistantes na placa e adicionado controle positivo (+) e controle negativo (-), com o intuito de verificar a eficiência do teste. Como controle negativo (-) foi utilizado o mesmo tipo do meio de crescimento dos isolados, enquanto para o controle positivo (+) utilizou-se esporos de *Paenibacillus elgii* (cepa AC13) na concentração 10^7 , que seguiu a mesma forma de inóculo em todos os isolados bacterianos testados. Para cada isolado foram utilizadas 3 placas de Peri como réplica biológica. O resultado positivo era considerado pela observação da formação de um halo de inibição no local do inóculo da bactéria que estava sendo testada.

4.6. Identificação molecular dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos que apresentaram atividade antimicrobiana, obtidos a partir de amostras das três espécies de corais, foram identificados por meio de métodos moleculares, com base na amplificação e filogenia do gene codificador do RNAr 16S. Para obter a amostra de DNA dos isolados bacterianos, foi realizado, primeiramente, o plaqueamento de cada um dos isolados em meio ágar Marinho ou SWA, sendo em seguida realizada a extração do DNA utilizando o kit Chelex 100 Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad). A extração foi realizada em tubo de microcentrífuga contendo 100µL de solução Chelex (concentração 5% p/v), onde uma ou duas colônias, dependendo do tamanho da colônia formada, foram adicionadas. Em seguida, os tubos levados ao banho-maria onde permaneceram por 15 minutos a 75°C antes de passar por centrifugação, durante 4 minutos a 18.928G. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o pellet descartado. As amostras de DNA extraído foram quantificadas pelo aparelho Qubit e armazenadas em freezer a -4°C.

Elas foram utilizadas como amostra doadora de DNA na PCR, tendo como iniciadores os primers 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') obtendo-se um amplicon com cerca de 1650pb (LANE, 1991). Como marcador molecular foi utilizado o padrão Ladder que consiste em 10 fragmentos de DNA variando de 1kbp a 10kbp.

Cada reação de PCR foi realizada utilizando os seguintes reagentes e concentrações indicadas: Tampão IO 10X, MgCl₂ 50mM, Taq polimerase 5U/µL (Kit Phoneutria), primer Forward - 27F 5µM, primer Reverse - 1492R, 5µM, dNTP 200 mM e, aproximadamente, 50ng de DNA, para um volume total de 30µL. Para cada PCR foram realizados 30 ciclos, em termociclador, nas seguintes condições: 3 minutos a 95°C para a pré-desnaturação 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 52°C (anelamento dos primers), 1 minuto e 40 segundos a 72°C para extensão das fitas, e 7 minutos a 72°C para extensão final. Após a amplificação, a purificação dos amplicons foi realizada utilizando o kit de purificação de produtos de PCR, Relia Prep TM DNA Clean-up and Concentration System (Promega) de acordo com o fabricante. Posteriormente o sequenciamento dos amplicons (30ng dos amplicons purificados) foi realizado no equipamento 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) disponível nos laboratórios do curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. As análises das sequências obtidas foram realizadas com o auxílio do software BioEdit (Ibis Therapeutics) (HALL, 1999) e analisadas e identificadas no Banco de dados "Ribosomal Database Project – RDP (COLE et. al., 2009) com o uso das ferramentas "Classifier".

4.7. Prospecção dos isolados produtores de metabólitos secundários por PCR

A possível síntese de metabólitos secundários pelos isolados obtidos da microbiota dos cnidários foi verificada a partir da prospecção de genes codificadores dos mesmos, por meio de amplificação de genes que codificam a expressão das enzimas PKS (Polyketides Synthases), que estão presentes nas vias que metabolizam PKS tipo I e II, e de enzimas NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetases), que produzem os NRPs (Non-Ribosomal Peptide). Policetídeos Sintase (Polyketides Synthases-PKSs), (CHAN et. al., 2006).

A técnica utilizada foi a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers específicos, seguindo o trabalho realizado por Macedo (2020), selecionados a partir da análise de trabalhos já realizados e disponíveis na literatura (Tabela 2). Estes são iniciadores correspondem a dois módulos, ACV1 e ACV3, do domínio de adenilação de cefamicina. Sendo assim, os 04 pares de primers codificam diferentes PKSs e NRPSs em grupos taxonômicos distintos. A tabela 2 apresenta a relação entre o gene alvo, o nome do primer, sua sequência, o tamanho do amplicon e a temperatura de anelamento dos primers. Do gene alvo NRPS, foram utilizados os primers A (A3F e A7R) e P (PSF e PSR), sendo o primer A com tamanho de 700 a 800pb e uma temperatura de anelamento de 56°C. O primer P apresenta um tamanho de 700pb a uma temperatura de 49°C. O par de iniciadores (ou primers) vai hibridar com a cadeia de DNA molde, tendo no início (iniciador 5' ou forward) e no fim (iniciador 3' ou reverse) do fragmento de DNA a amplificar (HUTCHINSON, 1999).

Para o gene alvo PKS foram utilizados os primers D (DKF e DKR) e K (KS α e KS β). Sendo o primer D apresentando 700pb e uma temperatura de anelamento de 51°C. O primer K apresenta um amplicon de 613pb e uma temperatura de anelamento de 58°C

Assim como no trabalho de Macedo (2020), o DNA da cepa de *P. elgii* foi utilizada como controle positivo nas PCRs utilizando os primers escolhidos para a prospecção de NRPS e PKS nos isolados bacterianos como controle das amostras de cada um dos isolados nas reações, foram realizadas PCRs utilizando primers para a amplificação do gene codificador do RNAr 16S. (conforme descrito no item anterior 4.6). Ao final da reação as amostras foram mantidas a temperatura de 10°C. A verificação da presença ou ausência do gene foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR obtidos com cada par de primer.

Tabela 2 - Gene alvo, sequência dos primers, temperatura de anelamento utilizados nas reações de amplificação e tamanho do amplicom esperado nas reações de PCR para a busca de metabolitos secundários dos cultivos oriundo de águas e material dos cnidários

GeneAlvo	Nome do Primer	Sequência do Primer(5'-3')	Tamanho do amplicon(pb)	Temperatura de anelamento(°C)
NRPS	A3F	GCSTACSYSATDTACACSTCSGG	700–800	56
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS		
	PSF	HGGHMANCCHAARGG	700	49
	PSR	TYGCCARGTCNCKGT		
PKS	DKF	GTGCCGGTNCRTGNGYYTC	700	51
	DKR	GCGATGGAYCCNCARCARMG		
	KS α	TSGCSTGCTTGGAYGCSATC	613	58
	KS β	TGGAANCCGCCGAABCCGCT		

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo, seleção e isolamento das amostras da microbiota dos cnidários.

Das três espécies de corais estudadas nesse trabalho, *M. alcicornis*, *M. harttii* e *P. dilatata* e sementeados em dois tipos de cultivo, Marinho e SWA, foram coletados um total de 182 isolados, conforme observado na tabela 3. Desses 182 isolados encontrados, 143 foram isolados da água que acompanhava o coral e 39 foram isolados dos próprios corais.

No cultivo da água em meio SWA (siglas terminadas em A) foram encontradas 52 colônias diferentes, e 91 colônias encontradas para água em meio Marinho (Siglas terminadas em M). Em relação às colônias encontradas para o coral, foram observados 8 isolados em meio SWA e 31 em meio marinho totalizando 39 isolados.

Podemos observar que o meio de cultura com maior quantidade de isolados foi o meio ágar Marinho com 122 isolados, enquanto o meio SWA teve aproximadamente 50% menos, com um total de 60 isolados (Tabela 3). O mesmo pode ser observado quando comparado em relação à quantidade de cada isolado em cada um dos meios, para as três espécies, é possível observar que todas tiveram um número maior de isolados no meio marinho em relação ao meio SWA (Tabela 3), o que pode ser justificado pelo fato do meio marinho ser um meio mais rico (quantidade de nutrientes) do que o meio SWA.

Tabela 3 - Número médio de colônias obtidas pelo plaqueamento em meio sólido das amostras de *M. alcicornis* e *P. dilatata* e *M. harttii* nos meios: Ágar Marinho e SWA.

LOCAL	MEIO/CORAL	N.º DE ISOLADOS	
		OBTIDOS	TOTAL
ÁGUA	AHA	23	52
	AMA	17	
	APA	12	
	AMM	29	91
	APM	27	
	AHM	35	
CORAL	PdA	03	08
	MaA	03	
	MHA	02	
	MaM	09	31
	MHM	20	
	PdM	02	

Com relação aos isolados de corais *M. harttii* foi a espécie com maior número de isolados, com 19 isolados em meio SWA e 55 em meio marinho. Quando analisamos a quantidade de isolados provenientes da microbiota cultivável do coral *M. harttii* em relação a quantidade de isolados também da microbiota cultivável do coral de *P. dilatata*, observamos que o coral *M. harttii* apresenta uma quantidade superior de isolados cultiváveis. Que poderia ser justificada pela colônia de *M. harttii* ser uma colônia inteira e cheia de reentrâncias favorecendo assim a presença de um maior número de associação de bactérias simbióticas e holobionts.

A espécie *M. harttii* é um dos corais construtores de recifes mais endêmicos no Brasil, estando presente tanto em locais rasos, como em locais mais profundos, podendo ser encontrado em profundidades de 2 a 80m, sendo assim, esse fato pode estar relacionado por sua maior abrangência. Sua presença em locais mais profundos pode servir como refúgio para as espécies em cenários de aquecimento global, o que também poderia influenciar na presença de um maior número de isolados bacterianos nesses corais, uma vez que poderiam estar presente em uma grande diferença de profundidade e temperatura, e sendo as condições climáticas e ambientais mais determinantes para a distribuição dos corais e de sua própria existência (DE OLIVEIRA *et. all*, 2019). O fato deste coral, possuir uma maior abrangência e plasticidade geográfica como citado por De Oliveira e colaboradores, 2019, poderia também explicar o maior número de isolados bacterianos neste coral do que os demais neste estudo.

Estes mesmos resultados foram encontrados por Macedo (2020) que trabalhando com isolamento de bactérias de corais e obteve maior quantidade de isolados de *M. alvicornis* do que *P. dilatata*. A autora também relaciona a densidade com a diversidade, pois, existe maior possibilidade de se obter maior diversidade de microrganismos em um substrato com mais microrganismos do que em um substrato onde a quantidade de microrganismos cultiváveis é menor.

Apesar da água do coral de *P. dilatata* apresentar um valor bem maior de isolados do que o coral propriamente dito, assim mesmo, o valor de isolados obtidos ainda é o menor das três espécies analisadas neste trabalho. Uma hipótese se deve ao fato do coral ser em forma de folha, o que facilita a passagem da água levando as bactérias aderidas ao coral. Como a água se movimenta entre várias espécies, podemos pensar que o aumento do número de isolados presentes na água de *P. dilatata* estaria relacionado ao fato da movimentação da água por outras espécies e com isso transportariam isolados aderidos em outras espécies de corais ou até mesmo outros organismos marinhos.

Os autores Voolstra e Ziegler (2020) descrevem em seu trabalho sobre uma hipótese de que a flexibilidade microbiana seria de grande importância para os corais se adaptarem as mudanças que ocorrem no ambiente recifal de uma forma mais dinâmica e rápida do que em relação aos processos

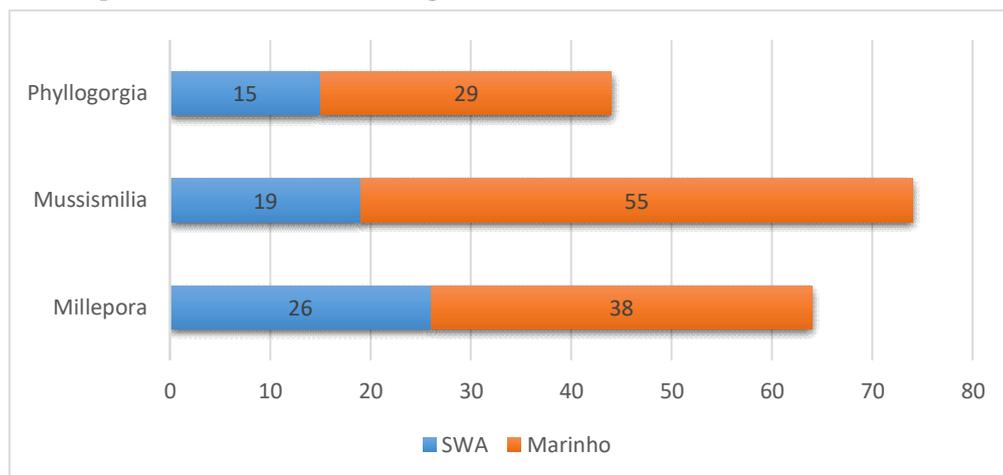
tradicionais de adaptação do organismo. No trabalho desses autores, eles apresentaram uma visão a respeito das interações coral-microrganismos, assim como forneceram um exame mais aprofundado das particularidades observadas em cada metaorganismo de coral. Ainda neste trabalho os autores relacionaram a flexibilidade do microbioma com os diferentes níveis de tolerância térmica em hospedeiros de corais que pertencem à mesma espécie e a flexibilidade do microbioma apresentar de forma diferenciada nas distintas espécies de corais.

Silveira e colaboradores (2017) analisaram as comunidades microbianas associadas a *Mussismilia braziliensis* durante um ciclo diurno e noturno comparando com coluna d'água que envolve o coral. Os autores descobriram que os táxons e as funções dominantes na comunidade de coral eram estáveis ao longo da escala de tempo da amostragem, sem mudanças significativas entre as amostras noturnas e diurnas.

Este trabalho pode ser utilizado como base para trabalhos complementares de estudo para as espécies estudadas em nosso trabalho, uma vez que a flexibilidade do microbioma poderia estar relacionada à diferença entre o microbioma associado ao coral e a água, uma vez que a água circunda diferentes espécies de corais e poderia estar conduzindo diferentes espécies de microrganismos. Os resultados de Macedo (2020) em seu trabalho com as espécies de corais: *Millepora alcicornis* e *Philogorgia dilatata*, corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde foram estudadas as espécies, uma vez que, dos isolados obtidos das três espécies estudadas no presente trabalho, *P. dilatata* foi a espécie que apresentou um menor número de isolados proveniente tanto do coral quanto da água que circundava o coral. Do coral foram obtidos 5 isolados e da água 39 isolados, sendo esses os menores valores comparando as três espécies.

A relação entre os corais escleractíneos e seus microrganismos associados é fundamental para a saúde dos ecossistemas dos recifes de corais. Microrganismos associados a corais (Symbiodiniaceae e outros protistas, bactérias, archaea, fungos e vírus) influenciam na saúde e na resiliência dos corais por meio da transferência de metabólitos, sinalização entre parceiros e troca genética. Recentes achados de interação íntima entre fitoplâncton e bactérias demonstraram que a troca obrigatória de recursos entre parceiros impulsiona de forma fundamental seu sucesso ecológico. Sendo assim, a relação microrganismo-coral sustenta a nutrição do holobionte e de coral, sua tolerância ao estresse e potencialmente influencia na futura sobrevivência dos ecossistemas de recifes de coral em condições de mudanças ambientais. Associações bacterianas são fundamentais para a saúde dos corais (MATTHEWS et. al, 2020).

Figura 7: Representação Gráfica do número de isolados bacterianos associados a água e aos corais *P. dilatata*, *M. harttii* e *M. alcicornis*, após isolamento em meio de ágar Marinho e SWA.



Na tabela 4, podemos observar os morfotipos isolados das três espécies de corais crescidos em meios de cultura Ágar Marinho e SWA. Podemos observar que o mais abundante dos morfotipos descritos para as três espécies de corais analisados foi pequeno, circular, com borda lisa, branca e cremosa. Estes morfotipos representam 39% do total de isolados, tanto em meio Marinho quanto em meio SWA (71 isolados). Ao contrário, o morfotipo menos abundante foi o representado por colônia pequena, circular, borda lisa, bege e cremosa, com apenas 1 isolado proveniente da água de *M. harttii* em meio marinho representando 0,55% de todas as colônias isoladas. Sendo o morfotipo de colônia pequena, circular, borda lisa, branca e cremosa, o mais abundante nos isolados da água, enquanto o morfotipo colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca e úmida foi o mais abundante nos isolados de coral. Em relação à morfologia bacteriana dos isolados, observou-se de maneira mais abundante, uma relação de 97,8% de bacilos e 2,2% de cocos. Porém a técnica é limitada, por falta de acuidade, uma vez que se utilizou microscopia ótica, o que inviabiliza uma identificação mais precisa de outros morfotipos (Tabela 4). Nos apêndices 1 e 2 estão descritos os isolados, sua diluição de origem, descrição do morfotipo da colônia encontrada em cada isolado e descrição dos isolados.

Tabela 4 – Descrição dos morfotipos isolados das três espécies de corais crescidos em meios de cultura Ágar Marinho e SWA.

MORFOLOGIA DA COLÔNIA	<i>M. alcornis</i>		<i>M. harttii</i>		<i>P. dilatata</i>		<i>M. alcornis</i>		<i>M. harttii</i>		<i>P. dilatata</i>		Total
	Água		Água		Água		Coral		Coral		Coral		
	MA	SWA	MA	SWA	MA	SWA	MA	SWA	MA	SWA	MA	SWA	
Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.					02	03		03		01		03	12
Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.			03		04	04				01			12
Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	09	13	13	11	13	02			09		01		71
Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa			05	01					06				12
Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	12	04	04	10	07	02			04				43
Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	08		05	01	01	01	01				01		18
Colônia média, circular, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, rosa, úmida.							08						08
Colônia pequena, circular, borda lisa, bege, cremosa			01										01
Tapete, marrom, cremosa, lisa			02										02
Tapete, branca, cremosa, lisa			02						01				03
Total	29	17	35	23	27	12	8	03	20	02	02	03	182

Em relação aos isolados AHM (provenientes de água de *M. harttii*) em meio marinho, foram isolados 35 morfotipos, com prevalência de colônias pequenas, lisas, cremosas que variavam entre colorações branca, amarela e marrom. Já das amostras de água de *M. alcornis* em meio marinho (AMM) foram encontrados menos isolados, onde dos 29 isolados foi observado uma prevalência de

colônias pequenas, lisa, redondas, de coloração branca ou amarela. As morfologias dos isolados são em sua maioria Bacilos, porém encontram-se também alguns em forma de cocos. A água de *P. dilatata* foi a que apresentou menos isolados nos dois meios utilizados, com morfotipos característicos de colônias lisas, cremosas, nas cores branca ou amarela, apresentando a morfologia dos isolados como Bacilos pequenos ou Bacilos médios.

Entretanto quando se trata de microrganismos relacionados diretamente ao coral no mesmo meio marinho (MHM) em *M. harttii* foram contados 20 isolados, sendo a característica prevalente de colônias lisas, redondas, cremosas, na coloração branca, marrom ou amarela diferente de *M. harttii* em água.

Para o coral de *M. alcicornis* em meio marinho (MaM) foram encontrados 09 isolados, apresentando o morfotipo de colônias lisas, cremosas, redondas, na coloração amarela com morfologia dos isolados de Bacilos pequenos. Já o coral de *P. dilatata* em meio marinho (PdM) foram encontrados 02 isolados com características dos morfotipos das colônias lisas, redondas, cremosa, pequenas, na coloração branca e amarela, apresentando morfologia dos isolados bacilos pequenos.

Em relação aos isolados em meio SWA, foram obtidos 60 isolados dos diferentes extratos semeados, como água e coral nas 3 diluições preparadas (Apêndice 2). Foram encontradas 23 amostras de água de *M. harttii* em meio SWA (AHA), onde foram obtidos isolados das 3 diluições de água e amostra do próprio coral.

5.2. Teste de atividade antimicrobiana por difusão em meio e identificação molecular dos isolados que mostraram atividade

Corais escleractíneos são descritos como os principais construtores de recifes de coral há milhões de anos, servindo de habitat para milhares de espécies marinhas. Os recifes de coral também são conhecidos como florestas tropicais marinhas, sendo considerado o ecossistema marinho com maior biodiversidade do mundo. No recife de coral, um indivíduo interage com várias espécies de microrganismos formando uma unidade biológica funcional chamada metaorganismo. Os microrganismos associados aos corais possuem funções como aquisição de energia e nutrientes e controle de patógenos, que promovem a aptidão do metaorganismo. Essas associações podem ser mais estáveis ou mais variáveis dependendo de fatores, como espécie do coral e as condições ambientais. Apesar de já conhecida há vários anos, a importância dos microbiomas de corais ainda permanece desconhecido em relação à diversidade e flexibilidade do microbioma dos corais (VILLELA, 2020). Existem vários relatos em relação a importante ação de atividades antimicrobianas de diversos isolados de diferentes espécies de corais e sua importância farmacológica.

O teste de atividade antimicrobiana do presente trabalho foi realizado com a metodologia de difusão em meio, em placas de cultivo com ágar Mueller Hinton devido a quantidade de isolados a serem avaliados e a diversidade de meios de cultivo que foram testados. Foi considerado um resultado positivo quando era observado a formação de halo de inibição completa (Fig.8A) ou uma inibição parcial apresentando uma atividade bacteriostática contra as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) (Fig.8B). Foram avaliados todos os 182 isolados, e crescidos em meio Marinho, SWA, Caldo Nutriente (CN), Luria Bertani (LB) e Tryptic Soy Broth (TSB) e a atividade foi analisada, em meio marinho e meio SWA contra os patogenos acima descritos. Em todas as repetições foram observadas crescimento de halo no controle positivo demonstrando dessa maneira a eficácia do teste com os esporos de *Paenibacillus elgii* (AC13), apresentando resultados antimicrobianos positivos contra estas bactérias que foram avaliadas (MACEDO, 2020).

Figura 8 - Placa de Cultivo com resultado dos isolados do teste de atividade antimicrobiana com o método difusão em meio, com bactérias. (A) Isolado com resultado positivo para *E. coli* em meio LB; (B) Isolado com atividade Bacteriostática para *S. aureus* em meio Caldo Nutriente.

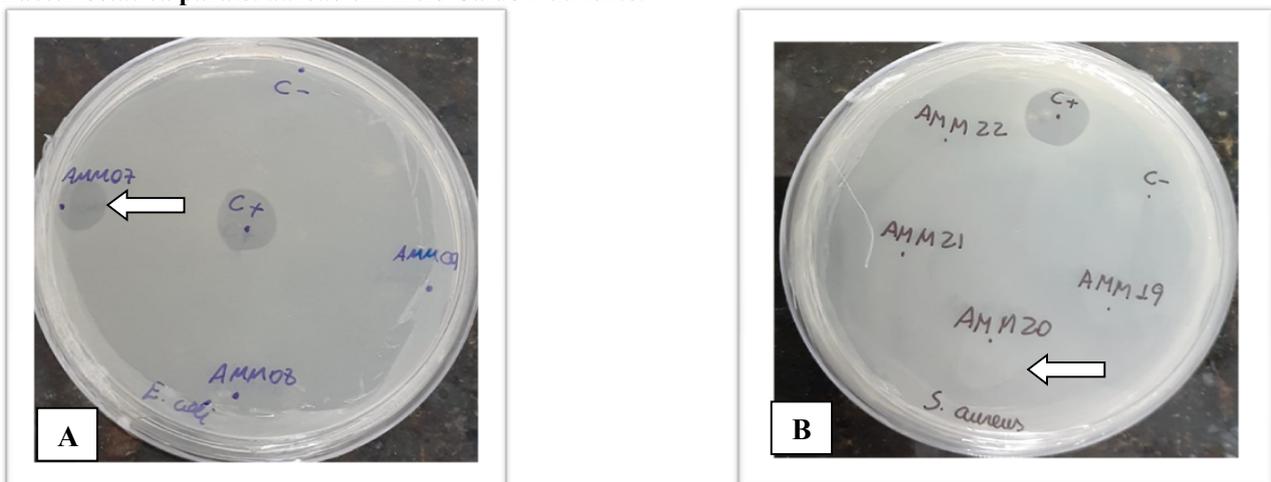


Foto da autora

Dos 182 isolados testados para a atividade antimicrobiana, foram encontrados 20 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* ou ambos, em meio Caldo Nutriente (CN) ou meio Luria Bertani (LB). Dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, 04 são provenientes dos isolados do coral e 16 dos isolados da água do coral (Tabela 5).

Estes 182 isolados foram avaliados quando a amplificação do gene codificador do RNAr 16S, onde observou a presença de amplicon na altura de 1650pb, mostrando a amplificação do gene comparado ao controle (+) utilizado. Entretanto somente os 20 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana foram purificados para o sequenciamento.

Em relação aos resultados obtidos no presente trabalho não foram encontrados resultados positivos

para atividade antimicrobiana dos isolados provenientes dos corais e da água de *M. harti*, *P. dilatata* e *M. alcicornis*, quando utilizado os meios SWA, Marinho e TSB, para nenhuma das cepas testadas. A ausência de resultados positivos em determinados meios de cultivo pode estar relacionada ao tipo de nutriente presente em cada um dos meios utilizados. Também podemos observar que o número de isolados bioativos recuperados depende da espécie estudada.

Estas nossas observações são confirmadas por Shnit-Orland e Kushmaro (2009) que sugerem em seu trabalho, que a avaliação da bioatividade vai depender do método de isolamento, das espécies estudadas e dos ensaios utilizados. Os autores afirmam ainda que fatores como espécie e quantidade de bactérias utilizadas no teste podem interferir nos resultados de atividades de bioativos.

Pode-se observar que nos resultados obtidos neste trabalho, o meio de cultura utilizado para o cultivo dos isolados também interferiu em relação a presença ou não de agentes antimicrobianos, o que infere que a composição nutricional dos meios de cultura pode estar diretamente relacionada a produção de certos metabólitos secundário, e assim influenciando na atuação dos diferentes isolados.

Dos 04 isolados com atividade antimicrobiana proveniente do coral, o isolado MHM 01 apresentou somente atividade contra a cepa *S. aureus*, porém para os meios CN e LB. Os isolados PdM 01; MHM 13 e PdA 02 apresentaram resultado positivo somente para a cepa de *E. coli* e apenas no meio CN.

Em relação aos isolados provenientes da água do coral foram obtidos 16 isolados com atividade antimicrobiana contra a cepa de *E. coli*, *S. aureus* ou ambas, em meio CN ou LB. O isolado AHA 24 apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, no meio LB. O isolado AMM 07 em meio LB apresentou atividade tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Os isolados AMM 13; AMM 16; AMM 17 e AMM18 apresentaram em meio CN atividade antimicrobiana contra a cepa de *S. aureus*. Porém já os isolados AMM 19; AMM 20; AMM 21 e AMM 22 apresentaram em meio CN tanto para *E. coli*, quanto para *S. aureus* atividade bacteriostática, já que não houve uma inibição completa do crescimento das cepas, e sim uma diminuição no crescimento tanto de *E. coli* quanto *S. aureus*.

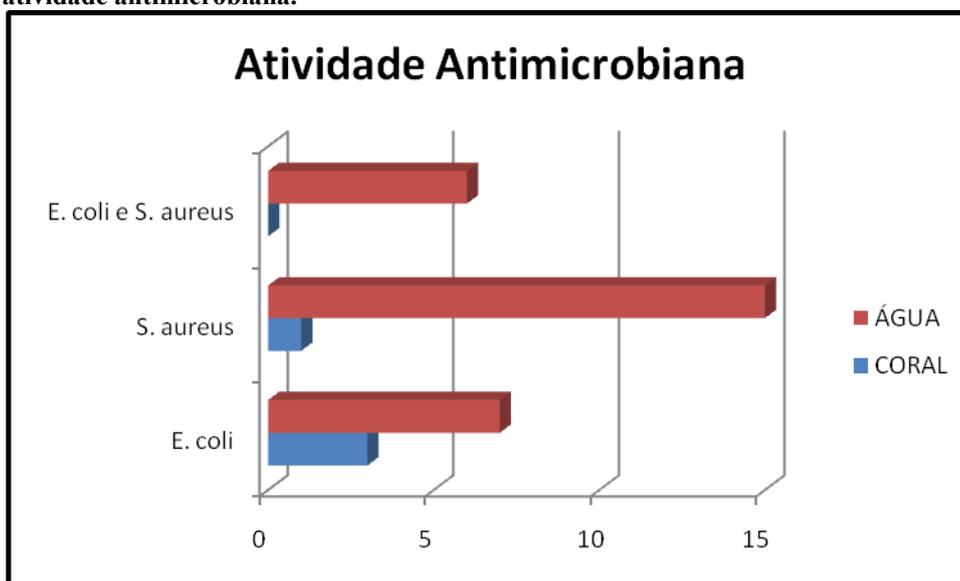
O isolado AMA 01 apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus* em meio CN. Os isolados APA 01; APA 03; APA 04; APA 05 e APA 06 apresentaram atividade antimicrobiana somente contra a cepa de *S. aureus* em meio CN.

A figura 9 apresenta a comparação quantitativa em relação aos isolados que apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* ou ambos. Observa-se que entre os isolados dos corais a maior quantidade de atividade foi contra a *E. coli*, enquanto para os isolados da água dos corais o maior quantitativo de atividade antimicrobiana foi contra *S. aureus*. Dessa maneira observa-se que os isolados dos corais apresentam melhores resultados contra bactérias Gram-negativas, enquanto os isolados da água do coral apresentam uma melhor resposta contra bactérias Gram-positivas. Para os

isolados dos corais não houve nenhum que apresentasse atividade tanto contra *E. coli* como contra *S. aureus*.

Já para os isolados provenientes da água do coral, AMM 07; 19; 20; 21 e 22 apresentam atividades antimicrobianas tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Observando que os isolados AMM 19, 20, 21 e 22 apresentaram uma atividade bacteriostática, por desenvolver uma inibição parcial das bactérias, enquanto, que, o isolado AMM 07 apresentou atividade bactericida, pois inibiu completamente o crescimento das bactérias.

Figura 9 – Representação gráfica apresentando a quantidade de Isolados do Coral e da água do Coral que apresentaram atividade antimicrobiana.



Segundo Buitrago (2019) foi realizado uma triagem de interações em meios sólidos, empregando 4 meios de cultura (PDA, ISP2, ISP3, LB), avaliando interações remotas e interações de contato de isolados marinhos. Permitindo a avaliação de interações devido a compostos difusivos e avaliação das interações devido a contato célula-célula.

Estudo de Elahwany e colaboradores (2013) relatam a presença de vinte isolados com atividade antimicrobiana associada com o coral *Sarcophyton glaucum*, representando uma proporção de 80% dos isolados obtidos. Essas descobertas apresentam atividades biológicas variadas em isolados associados a diferentes espécies de corais, em diferentes meios de cultura, o que enfatizam a importância dos estudos dos mesmos e quais os melhores meios devem ser utilizados para um aproveitamento mais eficiente de seus bioativos.

Moura e colaboradores (2021) descrevem que obtiveram 78 isolados de microrganismos do coral *Siderastrea stellata* coral. Os isolados foram semeados em meio de água marinha líquida e sólida para teste de atividade antimicrobiana, determinada pelo tamanho do halo, Dos 78 isolados 08 inibiram o

crescimento de *S. aureus* e *Salmonella typhi* porém sem apresentar atividades para inibição de *E. coli*.

De acordo com Moura e colaboradores (2021) certos isolados apresentaram atividade antimicrobiana em meio Mueller-Hinton (MH), mas quando cultivado em meio Ágar Marinho (AM) não apresentaram atividade antimicrobiana, reforçando com esses resultados a importância da influência do meio de cultura utilizado e sua interferência nos metabólitos produzidos pelos cultivos. Uma atividade antimicrobiana contra a bactéria EAEC foi observada em um isolado em meio AM enquanto quatro isolados inibiram o crescimento deste patógeno quando cultivado em meio MH.

A relação entre os antimicrobianos e a microbiota associada ao coral e a água possuem uma relação inversamente proporcional. Os resultados demonstram que *M. harttii* foi o coral que teve o maior número de microbiota associada, porém, o menor número de isolados antimicrobianos. Os isolados antimicrobianos podem possuir moléculas que exercem atividade antimicrobiana por não estar presente nas bactérias associadas a esse coral. Dessa forma não matam as outras bactérias que estão no coral.

Como observado no presente trabalho, a espécie de coral *P. dilatata* possui moléculas que exercem atividade antimicrobiana, enquanto que, a espécie de coral *M. harttii* e *M. alcicornis* não possuiriam essas moléculas, mas sim, uma ampla microbiota associada. Esses resultados podem ser confirmados através dos resultados obtidos por Macedo (2020), que observou que a quantidade de bactérias isoladas do coral *P. dilatata* foram as que menos apresentaram atividades contra *E. coli* e *S. aureus*.

De acordo com Lima et. al. (2013) o ecossistema marinho fornece uma grande diversidade de biomoléculas que podem ser utilizadas no tratamento de várias doenças. Nesse ambiente com grande competições para sobrevivência, os organismos precisam de barreiras químicas para minimizar ou evitar a contaminação por microrganismos. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) estão entre as moléculas que protegem esses animais. Em seu trabalho Lima et. al. (2013) testou extratos brutos de espécimes de coral *Carijoa riisei*, *Muriceopsis sulphurea*, *Neospongodes atlantica*, *Palythoa caribeorum*, *Phyllogorgia dilatata* e *Plexaurella grandiflora* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentando diferentes atividades.

O extrato bruto de *P. dilatata* apresentou atividade antibacteriana, e foi fracionado com sulfato de amônio (0-40%), sendo capaz de controlar o crescimento de *K. pneumoniae*, *S. flexineri* e *S. aureus*. Foi isolado um peptídeo denominado Pd-AMP1. Pd-AMP1 é capaz de inibir o desenvolvimento de *S. aureus*. A prospecção de biomoléculas protéicas e de potencial biotecnológico de animais marinhos é pouco explorada, porém poderiam servir como uma alternativa aos antibióticos comuns (LIMA et. al., 2013).

Macedo (2020) descreve em seu trabalho que aproximadamente 16,8% dos isolados obtidos de *M. alcicornis*, apresentaram resultado positivo para atividade antimicrobiana contra *E. coli* e 7,5%

apresentaram resultado positivo para atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Todos os isolados bacterianos observados possuem atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das cepas ATCC e foram identificados como sendo pertencente ao gênero *Vibrio* ou a família Vibrionaceae (MACEDO, 2020). No presente trabalho observa-se que dos resultados dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana, 4 isolados apresentaram atividade bacteriostática, tanto para as cepas de *E. coli* como para *S. aureus*, são pertencentes aos isolados obtidos da água do coral da espécie *M. alcicornis*, assim como todos pertencente ao gênero *Vibrio* ou a família Vibrionaceae, sendo que todos os 4 isolados apresentaram atividade bacteriostática contra *E. coli* e *S. aureus*, observando também que Macedo (2020) utilizou isolados de coral, enquanto o presente trabalho apresentou como positivo isolados provenientes da água, o que poderia justificar a diferença de atividade bacteriocida e a bacteriostática.

Dentre os 20 isolados sequenciados, 2 eram provenientes dos corais *M. harttii*, sendo eles: MHM 01 e MHM 13; e 2 isolados de *Philogorgia dilata* (PdM01 e PdA02), isto é, em relação aos isolados provenientes da água que apresentaram atividade antimicrobiana e foram sequenciados do coral *M. harttii* (AHA 24); *M. alcicornis* (AMM 07; AMM 13, AMM 16, AMM 18, AMM 19, AMM 20, AMM 21 e AMM 22; AMA 01) e *P. dilatata* (APA 01, APA 03, APA 04, APA 05 e APA 06). Esses isolados foram enviados para o sequenciamento, sendo utilizado o equipamento 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para sequenciamento deles.

A técnica utilizada de PCR com os primers 27F e 1491R para o gene do 16S foi essencial para amplificação do gene para identificação dos isolados. O gene amplificado possui 1650pb, porém o sequenciador utilizado possui uma capacidade de identificação de isolados até 800pb, o que interferiu em conseguir a identificação até espécie. Os isolados identificados são pertencentes a 6 gêneros diferentes, onde o com maior número de isolados foram os vibrios. Analisando os resultados obtidos pelo sequenciamento molecular, observamos que 60% dos gêneros observados pertencem a família vibrionaceae e 20% pertencem a família Bacillaceae, sendo que ambos estão reunidos como um único morfotipo quando observados em microscopia óptica por força da acuidade da técnica utilizada (Tabela 5 e Apêndice 3).

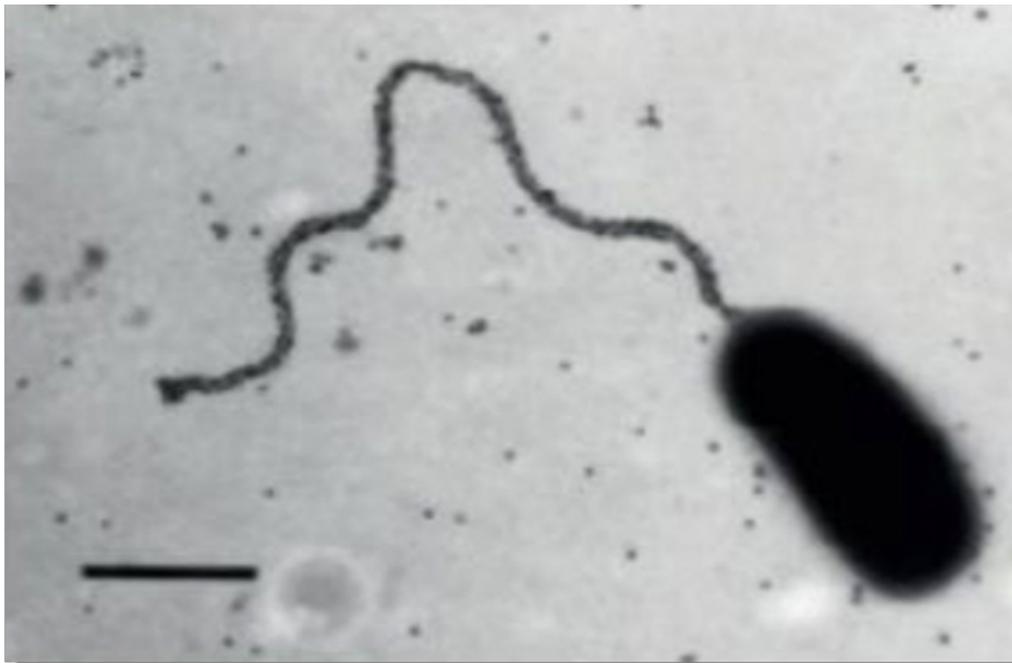
Tabela 5 – Procedência, caracterização morfológica e molecular e atividade microbiana dos isolados positivos nos testes microbianos.

Isolado Número	Procedência	Morfortipo	Caracterização Molecular (16S)	Halo de Inibição	Presença de halo		Meio de crescimento
					<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
1	MHM 01	Colônia pequena, puntiforme, amarela, úmida, elevada, borda lisa, translúcida,	Catenococcus	Total	-	+	LB e NA
2	PdM 01	Colônia pequena, puntiforme, elevada, borda lisa, opaca, branca, úmida.	Bacillus	Total	+	-	NA
3	MHM 13	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Vibrio	Total	+	-	NA
4	PdA 02	Colônia pequena, circular, elevada, borda lisa, opaca, branca, úmida.	Bacillus	Total	+	-	NA
5	AHA 24	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa	Catenococcus	Total	+	-	LB
6	AMM 07	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, translúcida, amarela, úmida	Idiomarine	Total	+	+	LB
7	AMM 13	Colônia pequena, circular, elevada, borda irregular, amarela, úmida.	Vibrio	Total	-	+	NA
8	AMM 16	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, amarela úmida.	Vibrio	Total	-	+	NA
9	AMM 17	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, amarela úmida.	Vibrio	Total	-	+	NA
10	AMM 18	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, amarela úmida.	Vibrio	Total	-	+	NA
11	AMM 19	Colônia média, circular, elevada, borda irregulares, amarela úmida.	Vibrio	Parcial	+	+	NA
12	AMM 20	Colônia pequena, circular, elevada, borda lisa, amarela úmida.	Vibrio	Parcial	+	+	NA
13	AMM 21	Colônia média, circular, elevada, borda	Vibrio	Parcial	+	+	NA

14	AMM 22	lisa, amarela úmida. Colônia média, circular, elevada, borda lisa, amarela úmida.	Vibrio	Parcial	+	+	NA
15	AMA 01	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, branca, úmida.	Bacillus	Total	+	+	NA
16	APA 01	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, opaca, amarela, úmida.	Vibrio	Total	-	+	NA
17	APA 03	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, opaca, branca, úmida.	Bacillus	Total	-	+	NA
18	APA 04	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, opaca, branca, úmida.	Pseudoalteromona s	Total	-	+	NA
19	APA 05	Colônia média, circular, elevada, borda lisa, opaca, branca, úmida.	Idiomarina	Total	-	+	NA
20	APA 06	Colônia pequena, puntiforme, borda lisa, branca, úmida.	Halomonas	Total	-	+	NA

Os Vibrios (Fig.10) possuem uma ampla variedade, com quase 74 espécies descritas para grupo (THOMPSON et. al., 2004), algumas com papel ecológico na natureza. A família Vibrionaceae compreende 8 gêneros: *Vibrio* (65 espécies), *Allomonas* (1 espécie), *Catenococcus* (1 espécie), *Enterovibrio* (2 espécies), *Grimontia* (1 espécie), *Listonella* (2 espécies), *Photobacterium* (8 espécies) e *Salinivibrio* (1 espécie) (THOMPSON et. al., 2005).

Figura 10– Imagem representativa do Gênero *Vibrio*. Aumento 1440 x 1035



Fonte: https://www.google.com/search?q=genero+vibrio&sxsrf=APq-WBsMS-nKx151lvGg8_p1DB3xz_47kQ:1647365750127&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwixwufS08j2AhVCrZUCHd8wCb4Q_AUoAXoECAIQAw&biw=1366&bih=657&dpr=1#imgrc=HPIFYabwRp74_M

Algumas espécies de *Vibrio* consideradas patogênicas possuem sua patogenicidade e epidemiologia ainda indefinidas. Porém são responsáveis por casos de mortalidade e perdas na economia (HERNÁNDEZ et. al., 2005). Na natureza os *Vibrios* podem apresentar um estado inativo, porém Colwell (2000) descreve que podem causar doenças. No ecossistema marinho, os *vibrios* desempenham papéis importantes como biodegradação de matéria orgânica e regeneração de nutrientes, eles também podem atuar como patógenos de organismos aquáticos de importância comercial, ou afetar seres humanos (THOMPSON et. al., 2004).

Campos (2011) descreve que bactérias do gênero *Vibrio* mesmo sendo responsáveis por promoção de doenças em corais, possuem várias espécies que são encontradas também em colônias saudáveis de *P. caribaeorum*. Bactérias como *V. communis*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, espécies conhecidas por serem patógenos de corais, foram encontradas tanto em colônias saudáveis como doentes.

A presença de *Vibrio* em colônias saudáveis é estigante, porém várias espécies podem estabelecer relações mutualísticas provendo nutrientes e metabólitos secundários para seus hospedeiros, até que algum estresse ambiental ative seus fatores de virulência causando danos aos hospedeiros. Alguns *vibriões* podem estabelecer relações mutualísticas importantes com os corais por serem, por exemplo, capazes de fixar o nitrogênio (CAMPOS, 2011).

A maioria dos *vibriões* patogênicos é resistente a antibióticos como, por exemplo, a oxitetraciclina, norfloxacin e ciprofloxacina pelo uso frequente em sistemas de cultura (MOLINA et. al., 2002). Levando assim, a uma necessidade de buscar alternativas ao uso de antibióticos como controle de patógenos. Uma variável seria o uso de *vibriões* nativos não patogênicos como potenciais probióticos e/ou simbiotes, onde podem atuar como agentes de biocontrole em organismos de cultivo reduzindo assim o uso de antibióticos e de lançamentos de efluentes tóxicos no meio ambiente (JAYASREE et. al., 2006; RIQUELME et. al., 2001).

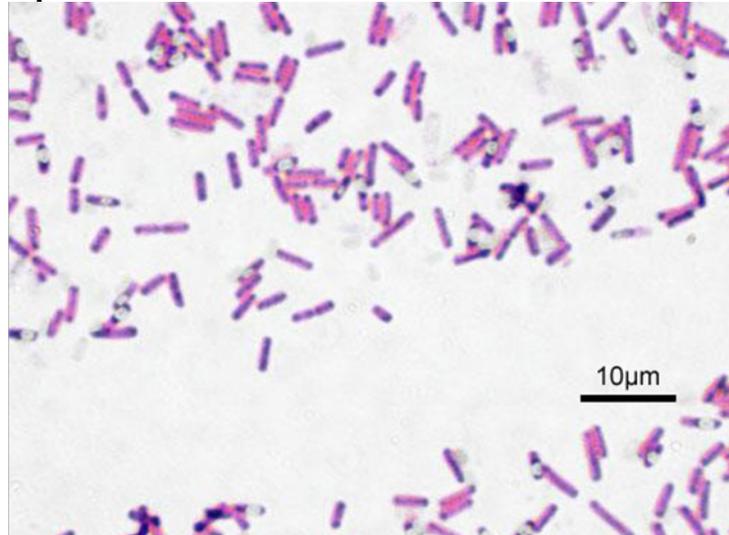
Os *bacilos* são sabidamente mais descritos nos trabalhos sobre a relação ao microbioma de cnidários que os *vibriões*, porém nesse estudo percebeu-se a predominância da família *Vibrionaceae* nos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana. Em relação a família *Bacillaceae* são bem descritas suas atividades antimicrobianas, assim como também atividades relacionadas a adaptação ao ambiente.

Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel funcional das comunidades bacterianas em suas associações com corais. A bioprospecção do muco dos corais revelou a existência de (10,42%) bactérias antagonicas contra os patógenos bacterianos testados. A taxonomia molecular (16S rRNA) provou a identidade dessas bactérias antagonistas pertencem a *Enterobacter cloacae* (CM1), *Bacillus subtilis* (CM2), *Bacillus sp.* (CM11) e *Bacillus marisflavi* (CM12). Uma triagem secundária enfatizou que o extrato de acetato de etila de *B. subtilis* apresentou forte efeito antagonico, seguido pelo extrato clorofórmio de *E. cloacae* e acetato de etila extrato de *B. marisflavi* (AHILA et. al., 2017).

Cavalini (2019) descreve a respeito dos peptídeos antimicrobianos que são derivados de espécies de *Bacillus*, (Fig. 11) apresentam um potencial inibitório para diversos patógenos, o que os tornam um ponto de partida com perspectiva na busca por novas substâncias antimicrobianas. Compostos como esses são utilizados em diversas áreas na qualidade e segurança de alimentos e saúde das pessoas. Bactérias e fungos marinhos são relatados como produtores de tais compostos devido aos seus mecanismos de defesa e subprodutos metabólicos. Apesar do número de produtos naturais isolados dessas classes da flora microbiana marinha ser grande, um número limitado desses compostos chega ao ensaio clínico e poucos são aprovados como medicamento (BHATNAGAR; KIM, 2012).

Neste trabalho ficou demonstrado a possibilidade da utilização da bipspeção para a obtenção de novas drogas antimicrobianas para utilização biotecnológica. Esta também será a estratégia adotada nesta dissertação.

Figura 11 – Imagem representativa do Gênero *Bacillus*. Aumento 500 x 375.



Fonte: https://www.google.com/search?q=genero+bacillus&tbm=isch&ved=2ahUKEwjoiivPU08j2AhXdA7kGHZNADeAQ2-cCegQIABAA&oeq=genero+bacillus&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECAAQHjoHCCMQ7wMQJzoGCAAQBRAeOgUIABCABDoICAAQgAQQsQM6CwgAEIAEELEDEIMBOgYIABAIEB5Q5wZYhSxg-y1oAHAAeACAAY0BiAGuDZIBBDauMTSYAQcGAgAQGqAQtd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&scient=img&ei=es4wYujlHt2H5OUPk4G1gA4&bih=657&biw=1366#imgrc=RkjtosN-L9NGRM

5.3. Prospecção de isolados produtores de metabólitos secundários por PCR

Com o objetivo de encontrar genes que apresentam atividade antimicrobiana, os 182 isolados obtidos, no presente trabalho, foram testados para a amplificação de 04 diferentes pares de primers relacionados a genes que apresentam atividades de metabólitos secundárias e bioativos. Posteriormente, os isolados encontrados nesse estudo e que apresentaram resultados positivos para a atividade antimicrobiana, foram sequenciados com o objetivo de encontrar a identificação deles. A verificação da presença ou ausência do gene foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR obtidos com cada par de primer.

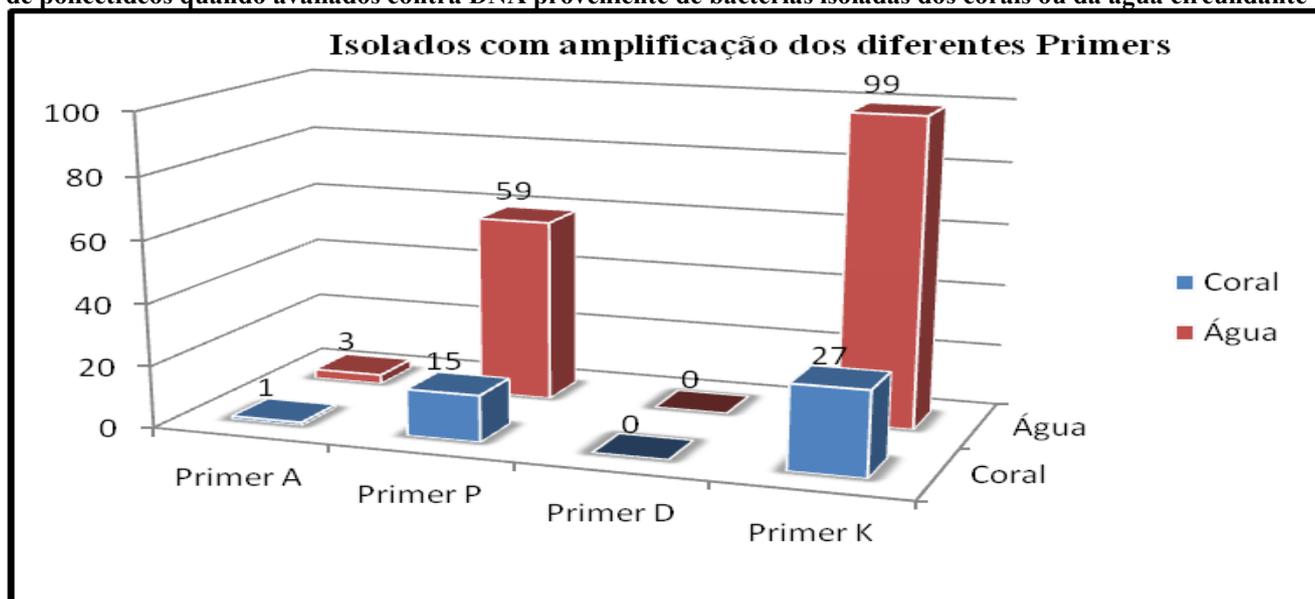
Dos 182 isolados testados para os 04 diferentes pares de primers de interesse, foram identificados 43 isolados, provenientes do coral, positivo para pelo menos um dos diferentes primers e 134 isolados, positivos, provenientes da água do coral. Os isolados bacterianos isolados das águas dos corais produziram maior amplificação em todos os primers do que os microrganismos isolados do próprio coral, se levarmos em consideração a proporção de amplificação entre isolados de corais e água, foi de, 28% maior de isolados da água em relação aos isolados do coral. Essa variação de percentual se dá pelo fato de termos um total de 39 isolados dos corais e 143 isolados da água dos corais.

Na figura 12 podemos observar a amplificação dos diferentes pares de primers amplificados a partir de bactérias cultiváveis provenientes do coral e da água de coral. O maior número de amplificações ocorreu quando avaliado o primer K (Figura 13). Para o primer A somente 01 isolado, do coral *Mussismilia harttii*, mostrou amplificação, enquanto em relação a água dos corais mostraram 03 amplificações, sendo 02 da espécie de coral *Mussismilia harttii* e 01 da espécie *Millepora alcicornis*. Para o primer P foram encontrados 15 amplificações para o material proveniente do macerado dos corais e 59 positivos para a água de coral. Analisando o primer k encontrou-se 27 positivos para o coral e 99 positivos para a água do coral. Na análise do primer D não foram encontrados isolados positivos no coral e nem na água de coral. Se consideramos a proporção das amplificações, observamos que o primer A apresenta uma proporção de 2,5% de isolados positivos dos corais e 2,1% dos isolados positivos da água do coral. Para o primer P observou-se uma proporção de aproximadamente 37,5% em relação aos isolados dos corais e 41,6 dos isolados da água. O primer K apresentou um proporção de mais ou menos 67,5% de positivo para os isolados da água e 69,7% para os isolados do coral. Somente o primer D não foi obtido amplificação para nenhum isolado, nem os provenientes do coral e nem os da água de coral. Essa condição em relação ao primer D de não apresentar nenhum isolado positivo se dá em relação ao fato de ser um primer codificador de um gene bem específico para atividade antimicrobiana.

Para o primer A foi encontrado apenas 01 isolado, do coral *Mussismilia harttii*, positivo, enquanto em relação à água do coral foram encontrados 03, sendo 02 da espécie de coral *Mussismilia harttii* e 01 da espécie *Millepora alcicornis*. Para o primer P foram encontrados 15 positivos para o material proveniente do macerado dos corais e 59 positivos para a água de coral. Analisando o primer k encontrou-se 27 positivos para o coral e 99 positivos para a água do coral. Na análise do primer D não foram encontrados isolados positivos no coral e nem na água de coral (Fig. 12).

Essa condição em relação ao primer D de não apresentar nenhum isolado positivo se dá em relação ao fato de ser um primer codificador de um gene bem específico.

Figura 12 – Representação gráfica dos resultados obtidos a partir das ampliações dos difentes tipos de primers de policetídeos quando avaliados contra DNA proveniente de bactérias isoladas dos corais ou da água circundante



Em seus estudos González, Sigrist e Paulo (2016) descrevem que os peptídeos não ribossomais (NRP) são uma classe de produtos naturais produzidos, principalmente, por bactérias e fungos filamentosos. Sendo compostos biossintetizados a partir de mecanismos enzimáticos multimodulares, denominados sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS). A incorporação de um substrato é designada por cada módulo pela elongação e modificação química da cadeia do polipeptídeo. Os NRP possuem grande atividade biológica e sua ação antibiótica é de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, no intuito de enfrentar um dos maiores desafios da medicina atual, que é a multirresistência bacteriana aos medicamentos atualmente em uso.

Alguns antibióticos e antitumorais são exemplos de produtos de metabólitos secundários produzidos por microrganismos que possuem o sistema de módulos ou domínios denominados PKSs. Como exemplo podemos citar os antibióticos streptomina como granamicina, tetracenomicina e actinorodina e a epotilona que pode ser utilizada como novos análogos de uma droga anticâncer (NICOLAOU; ROSCHANGAR; VOURLIOMIS, 1998). Shnit-Orland e Kushmaro (2009) em seu trabalho afirmam ainda que fatores como espécie e quantidade de bactérias utilizadas no teste podem interferir nos resultados de atividades de bioativos. Nossos resultados estão de acordo com os autores, pois, podemos observar que 177 isolados apresentaram amplificação para pelo menos um dos primers testados, ou seja, aproximadamente 97,25 % dos isolados estudados no presente trabalho possuem pelo menos um gene que pode codificar moléculas bioativas para atividade antimicrobiana.

O estudo da microbiota associada a esses corais pode levar a um real fator de presença de fonte produtora de compostos com atividades antimicrobianas, já que os metabólitos secundários de

alguns dos microrganismos isolados apresentaram atividade antimicrobiana, nos testes realizados, e apresentaram presença de gene que possa participar da expressão de enzimas do tipo NRPS ou PKS.

A teoria a respeito da produção de moléculas bioativas encontradas em organismos marinhos, está relacionada a produção realizada pelos microrganismos associados, demonstrando uma necessidade de uma investigação mais aprofundada da microbiota dessas espécies de corais, para a compreensão do que existe entre a relação da microbiota dos microrganismos nos cnidários que se agregam, onde essa flexibilidade do microbioma possa ser explorada para promoção da resiliência e resistência dos corais para superar as mais variadas pressões ambientais (VOOLSTRA e ZIEGLER, 2020).

Alguns microrganismos possuem um papel contingente na ortogenia dos organismos como autodefesa, agressão ou até comunicação por produzirem riquezas de metabólitos não comuns (STROHL, 1997). Muitos desses metabólitos são utilizados para produção de fármacos, como antibióticos e outras drogas naturais. Porém a resistência geral aos antibióticos entre patógenos humanos, animais e agrícolas veio no último século trazendo ameaças para seu uso. Apesar de empresas farmacêuticas utilizarem programas de triagem direcionada para a utilização desses metabólitos, observa-se cada vez mais a diminuição de se encontrar novas drogas para uso farmacêutico (HUTCHINSON, 1999). O estudo da comunidade bacteriana cultiváveis que estão associadas aos corais, demonstra o início para a descoberta de estratégias de associação desses microrganismos e os cnidários, entendendo dessa maneira os mútuos benefícios dessa associação. Diferentes formas de cultivos podem trazer informações complementares para um melhor aproveitamento desses metabólitos secundários produzidos por essas bactérias. Dessa maneira além de ajudar na produção de novos fármacos e produtos tecnológicos, também irão contribuir para minimizar os impactos sofridos pelos cnidários por várias décadas.

Os 20 isolados que mostraram atividade antimicrobiana tiveram a região 16S do DNA sequenciada. A tabela 6 relaciona os resultados dos isolados que tiveram atividade antimicrobiana com amplificação dos 4 Primers testados.

Nenhum dos 20 isolados com atividade antimicrobiana positiva apresentou amplificação para os primers A e D, que possuem uma maior especificidade. Para o primer P dos 20 isolados, 10 amplificaram esse primer, sendo 8 da família Vibrionaceae, 1 Idiomarinaceae e 1 Pseudoalteromonadaceae. No primer K dos 20 isolados, 13 tiveram a banda de amplificação para o primer, sendo 9 isolados da família Vibrionaceae, 2 da família Idiomarinaceae e 2 da família Bacillaceae. Os 2 isolados que foram sequenciados da família Idiomarinaceae do total de 20 isolados sequenciados, mostraram amplificação para o primer K.

A família que apresentou uma maior quantidade de isolados foi a família Vibrionaceae com um total de 12 isolados, apresentando um percentual de 60% do total de isolados que apresentaram

atividade antimicrobiana.

A família Bacillaceae apresentou 20% com um total de 4 isolados, enquanto a família Idiomarinaceae com 2 isolados apresentou um percentual de 10% e as famílias Pseudoalteromonadaceae e Halomonadaceae cada uma com apenas 1 isolado apresentou um percentual de 5% cada.

Tabela 6 – Apresentação dos resultados dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana e a amplificação dos primers.

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers				Atividade Antimicrobiana			Meio de cultura	Família
	A3F/A7 R	PSF/ R	DKF/R	KSα/KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			
MHM 01	-	+	-	-	-	+	LB/NA	Vibrionaceae	
PdM 01	-	-	-	-	+	-	NA	Bacillaceae	
MHM 13	-	-	-	+	+	-	NA	Vibrionaceae	
PdA 02	-	-	-	-	+	-	NA	Bacillaceae	
AHA 24	-	+	-	-	+	-	LB	Vibrionaceae	
AMM 07	-	-	-	+	+	+	LB	Idiomarinaceae	
AMM 13	-	-	-	+	-	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 16	-	+	-	+	-	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 17	-	+	-	+	-	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 18	-	+	-	+	-	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 19	-	+	-	+	+	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 20	-	+	-	+	+	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 21	-	+	-	+	+	+	NA	Vibrionaceae	
AMM 22	-	+	-	+	+	+	NA	Vibrionaceae	
AMA 01	-	-	-	+	+	+	NA	Bacillaceae	
APA 01	-	-	-	-	-	+	NA	Vibrionaceae	
APA 03	-	-	-	+	-	+	NA	Bacillaceae	
APA 04	-	-	-	-	-	+	NA	Pseudoalteromonadaceae e	
APA 05	-	+	-	+	-	+	NA	Idiomarinaceae	
APA 06	-	-	-	-	-	+	NA	Halomonadaceae	

Madigan et. al. (2016) descreve que o filo Proteobacteria é o mais diverso grupo bacteriano, abrangendo mais de um terço das bactérias já caracterizadas. É neste filo que se encontra a maioria das bactérias que possuem algum interesse agrícola, médico e industrial. A ordem Vibrionales,

pertencente a esse filo, na qual se encontram os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Allomonas*, apresentam células em formato de bacilo ou víbrio, são, em sua maioria, aquáticos, podendo ser encontrados em ambientes de água doce ou salgada, e apresentam organismos bioluminescentes.

Segundo Campos (2011) vários estudos demonstraram a respeito da importância do complexo holobiont para a saúde dos corais e dos ecossistemas recifais de forma geral. Como constituintes comuns da microbiota associada aos cnidários pode ser citada espécies dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus* e *Paracoccus* e o filo Proteobacteria praticamente é o mais comum dentro dessas comunidades microbianas. Para uma análise desta diversidade, técnicas de cultivo e independentes de cultivo são empregadas em conjunto por serem complementares. Acredita-se que até 95% dos microrganismos não são cultiváveis, metagenomas de muitos ambientes tem sido explorados para acessar a diversidade desses microrganismos de inúmeras fontes, inclusive dos cnidários.

O filo Firmicutes apresenta bactérias que podem formar endósporos, são Gram-positivas e apresentam em seu material genético uma baixa taxa de GC (Guanina-Citosina). Dentro desse filo encontramos a ordem Bacillales, cujo principal gênero é *Bacillus*, sendo caracterizado por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, podendo ou não formar endósporos e vários dos microrganismos pertencentes à esse gênero pode produzir moléculas antibióticas, como polimixina, tirocidina e gramicidina (MADIGAN et. al., 2016).

Segundo Vilela et. al. (2021) foi realizada a investigação da produção de enzimas comercialmente importantes por 37 cepas de bactérias isoladas das espécies de corais *Mussismilia braziliensis*, *Millepora alcicornis* e *Porites astreoides*. Ensaio enzimáticos in vitro foram realizados, demonstrando que até 56% dos isolados produziram pelo menos uma das sete enzimas selecionadas, sendo elas: lipase, caseinase, queratinase, celulase, quitinase, amilase e gelatinase. Uma cepa, identificada como *Bacillus amyloliquefaciens*, produziu todas as enzimas. As comunidades microbianas cultivadas e não cultivadas que eram específicas de espécies de corais foram identificadas. O filo Firmicutes predominou entre os isolados, incluindo os gêneros *Exiguobacterium*, *Bacillus* e *Halomonas*, entre outros. A utilização de métodos diferentes de sequenciamento e o cultivo de bactérias apresentaram dados semelhantes e complementares em certos gêneros detectados por um ou outro método. De acordo com os autores, os resultados demonstraram a importância de explorar diferentes espécies de corais como fontes de microrganismos específicos de interesse biotecnológico e industrial, ao mesmo tempo reforçando a importância econômica e ecológica dos recifes de corais como reservatórios de tal diversidade.

6. CONCLUSÕES

- 1) Esse trabalho proporcionou o estudo de diferentes bactérias associadas aos corais ou a água próxima aos corais. Foram analisadas 3 espécies de Corais: *Millepora alcicornis*, *Mussismilia harttii* e *Phyllogorgia dilatata*, perfazendo um total de 182 isolados nas três espécies. Desses 182 isolados, 20 apresentaram atividade antimicrobiana com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância médica. O que demonstra a grande importância e necessidade de se estudar outras espécies de corais e de outras regiões.
- 2) Em relação a atividade antimicrobiana, com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, todas as três espécies de corais estudadas apresentaram isolados com resultados positivos para pelo menos uma bactéria, porém somente a espécie *Millepora alcicornis* apresentou isolados com atividade bactericida e bacteriostática, enquanto as demais espécies apresentaram somente atividade bactericida, com a técnica de difusão em meio. Dessa maneira observa-se a presença de isolados com potencial produção de compostos antimicrobianos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- 3) Apesar de que alguns halos de inibição apresentados foram bem visíveis e outros mais modestos, esses resultados reforçam a importância de uma maior pesquisa em relação a essas teorias, uma vez que podemos estar diante de novas drogas potencialmente bactericidas. Porém existe a necessidade de se observar os meios utilizados, uma vez que cada meio disponibiliza diferentes tipos e quantidades de nutrientes, fazendo com que a expressão desses metabólitos estejam ativos quando cultivados em certos meios e em outros não apresentam atividade. Cultivo com esses isolados, positivos para ação antimicrobiana, em diferentes meios de cultura testados, com outras fontes de carbono, ou em condições de estresse, com mudanças de temperatura ou co-cultivo, podem potencializar a produção de metabólitos e a atividade antibiótica desses organismos.
- 4) Todos os 182 isolados foram testados para a amplificação de Primers dos genes específicos para a atividade antimicrobiana. Sendo testado 4 pares de primers específicos, onde observou-se a amplificação de 177 isolados em pelo menos 1 dos pares de Primers testados.
- 5) Dentre os isolados, do presente trabalho, que apresentaram amplificação para algum dos primers testados, uma quantidade significativa não apresentou atividade antimicrobiana quando testada em difusão em meio, podendo estes estarem silenciosos, onde, a expressão seria dependente de algum fator externo, podendo ter relação com a quantidade nutricional dos meios utilizados ou algum fator de estresse sendo estimulada “*in vitro*” durante seu cultivo (SHNIT-ORLAND e KUSHMARO, 2009).
- 6) Pode-se observar que nos resultados obtidos nesse trabalho, o meio de cultura utilizado para o cultivo dos isolados também interferiram em relação a presença ou não de agentes antimicrobianos, o

que infere que a composição nutricional dos meios de cultura pode estar diretamente relacionada a produção de certos metabólitos secundário, e assim influenciando na atuação dos diferentes isolados.

7) Esses resultados se tornam promissores por apresentarem novos horizontes para estudos de novas técnicas e metodologias, que possam ampliar o campo de observação em relação a interação dessas bactérias e seus cnidários associados, trazendo assim novos conhecimentos e entendimentos para pesquisas futuras, melhorando formas de preservação para esses ecossistemas tão necessário para a vida marinha.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHILA N.K., PRAKASH S., MANIKANDAN B., RAVINDRAN J., PRABHU N. M., KANNAPIRAN E. **Bio-prospecting of coral (*Porites lutea*) mucus associated bacteria, Palk Bay reefs, Southeast coast of India.** Elsevier. *Microbial Pathogenesis* 113 (2017) 113 e 123.

ALMEIDA, M. T. R. et. al.. **Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast** *Brazilian Journal of Pharmacognosy* Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 1jul. 2014.

AMARAL, F. M. D. e Colaboradores. **An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (Hydrozoa: Cnidaria), including the description of a new species.** *Zootaxa*, v. 68, p. 56–68, 2008.

BAUER, A. W. et. al.. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n.4, p.493–496, 1966.

BETZ, J. DER MARDEROSIAN, A. **Antimicrobial activity of marine organisms** 1991. *Marine Technology Society journal*. Vol. 25. Pag. 57-64. ISSN: 0025-3324.

BHATNAGAR I; KIM S. **Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective.** *Environmental toxicology and Pharmacology*. 2012. 631-643.

BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v.2, n.5, p.1297–1305, 2007.

BUDD AF, FUKAMI H, SMITH ND, KNOWLTON N. **Taxonomic classification of the reef coral family Mussidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia).** *Zool J Linn Soc*. 2012;166(3): 465–529.

BUITRAGO P. A. M. **Cocultivo de microorganismos de origen marino como estrategia para la producción diferencial de metabolitos especializados.** 2019. Tesis maestría. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogota. Colombia.

CAMPOS F. F. **Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo *palythoa caribaeorum* (cnidaria, anthozoa) do litoral sul de pernambuco.** 2011. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Saúde. Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco.

CASTRO CB, MEDEIROS MS, LOIOLA LL. **Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) from Brazilian reefs.** *J Nat Hist*. 2010; 44(13–14): 763–827.

CASTRO CB, PIRES DO. **Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing.** *Bull Mar Sci*. 2001;69(2): 357–371.

CASTRO, C. B. E. **Revisao sistematica dos octocorallia (coelenterata, anthozoa) dos**

- recifes de abrolhos, BA, Brazil.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1986.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. **Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing.** *Bulletin of Marine Science*, v. 69, n. 2, p. 357–371, 2001.
- CAVALINI L. **Caracterização da atividade antimicrobiana produzida por bacillus sp. isolado de sedimento de áreas úmidas.** 2019. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre.
- CHAN-HEE K. et.al. **Identification of a novel antimicrobial peptide from the sea star *Patiria pectinifera*.** *Developmental & Comparative Immunology* Volume 86, September 2018, Pages 203-213
- CHAN, Y. A. et. al.. **Hydroxymalonyl-acyl carrier protein (ACP) and aminomalonyl-ACP are two additional type I polyketide synthase extender units.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 39, p.14349–14354, 26 set. 2006.
- CHUN L. et. al.. **Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*.** Elsevier. *Developmental & Comparative Immunology*. Volume 34, Issue 9, September 2010, Pages 959-968
- COLE, J. R. et. al.. **The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis.** *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 141–145, 2009.
- CONTI R.; GUIMARAES D. O.; PUPO M.T. **Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos.** *Ciência e Cultura* vol.64 no. 3 São Paulo 2012. ISSN 0009-6725. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300014>
- COLWELL, R., HUQ, A. **Marine ecosystems and cholera.** *Hydrobiologia* 460, 141–145 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1013111016642>
- CURDIA J., MONTEIRO P., AFONSO C.M.L., SANTOS M.N., CUNHA M.R., GONCALVES J.M.S. **Spatial and depth-associated distribution patterns of shallow gorgonians in the Algarve coast (Portugal, NE Atlantic)** *Helgol. Mar. Res.* 2013; **67**:521–534. Doi: 10.1007/s10152-012-0340-1.
- DALY M., BRUGLER MR, CARTWRIGHT P., COLLINS AG, DAWSON MN, FAUTIN DG, FRANCE SC, MCFADDEN CS, OPRESKO DM, RODRIQUEZ E., et. al.. **The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.** *Zootaxa*. 2007; 1668:127–182.
- DEMAIN, A. L. **Induction of microbial secondary metabolism.** [s.l.] Springer- Verlag Ibérica, 1998.
- DE OLIVEIRA UDR, GOMES PB, SILVA CORDEIRO RT, DE LIMA GV, PÉREZ CD. **Modeling impacts of climate change on the potential habitat of an endangered Brazilian**

endemic coral: Discussion about deep sea refugia. PLoS One. 2019 May 21;14(5): e0211171. doi: 10.1371/journal.pone.0211171. PMID: 31112555; PMCID: PMC6529159.

EPIFANIO, R. D. A. et. al.. **Chemical defenses against fish predation in three Brazilian octocorals: 11 β ,12 β -epoxy pukaideasa feeding deterrent in *Phyllogorgia dilatata*.** Journal of Chemical Ecology, v.25, n.10, p.2255–2265,1999.

ELAHWANY AM, GHOZLAN HA, ELSHARIF HA, SABRY SA. **Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*.** J Basic Microbiol. 2015 Jan;55(1):2-10. doi: 10.1002/jobm.201300195. Epub 2013 Aug 29. PMID: 23996153.

FERNANDES P. A. V. et. al. **Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria.** Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38:704-709 ISSN 1517-8382 704.

FERNANDO SC, WANG J, SPARLING K, GARCIA GD, FRANCINI-FILHO RB, DE MOURA RL, PARANHOS R, THOMPSON FL, THOMPSON JR. **Microbiota of the major South Atlantic reef building coral *Mussismilia*.** Microb Ecol. 2015 Feb;69(2):267-80. doi: 10.1007/s00248-014-0474-6. Epub 2014 Sep 12. PMID: 25213651.

FERREIRA, B. P.; MAIDA, M. **Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil: situação e perspectivas.** [s.l.] MMA/SBF, 2006.

FREIWALD, A. et. al.. **Cold-water coral reefs: out of sight-no longer out of mind.** UNEP-WCMC, 2004.

GARCIA, T. M. **Macrofauna associada a *Millepora alcicornis* em áreas sob diferentes níveis de influência do turismo subaquático na APA Estadual Recifes de Coral.** v. 1758, p.110,2006.

GARCIA, T.; MATTHEWS-CASCON, H.; FRANKLIN-JUNIOR, W. ***Millepora alcicornis* (Cnidaria: Hydrozoa) as substrate for benthic fauna.** Brazilian Journal of Oceanography, v. 57, n. 2, p. 153-155, 2009.

GARCÍA-ARREDONDO A, ROJAS A, IGLESIAS-PRIETO R, ZEPEDA-RODRIGUEZ A, PALMA-TIRADO L. **Structure of nematocysts isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa)** J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2012; 18 (1):109–115. doi: 10.1590/S1678-91992012000100014.

GARCÍA-DAVIS S. et. al.. **Bioprospecting Antiproliferative Marine Microbiota From Submarine Volcano Tagoro.** Frontiers in Marine Science. July 2021. Volume 8. Article 687701. doi: 10.3389/fmars.2021.687701

GONTANG, E.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3272-3282, 2007.

GONZÁLEZ G. D. T., SIGRIST R. PAULO B. S. **Avanços Recentes na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais.** Revista Virtual

de Química. Volume 8, Número 6. Novembro-Dezembro 2016. ISSN 1984-6835 1999

HALL, T. A. **Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium, v.41, p.95–98, 1999.

HEINEMANN, M.; SAUER, U. **Systems biology of microbial metabolism** *Current Opinion in Microbiology*, jun. 2010.

HERNÁNDEZ-MATEHUALA R., ROJAS-MOLINA A., VUELVAS-SOLÓRZANO A. A., ALEJANDRO GARCIA-ARREDONDO A., ALVARADO C. I., OLGUÍN-LÓPEZ N., AGUILAR M. **Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora alcicornis* collected in the Mexican Caribbean and detection of two types of cytotoxins.** *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2015; 21: 36. Published online 2015 Sep 25. Doi: 10.1186/s40409-015-0035-6. PMID: 26413086

HETZEL B, CASTRO C. **Corais do Sul da Bahia.** *Rio de Janeiro: Nova Fronteira*; 1994.

HOCKETT, K. L.; BALTRUS, D. A. **Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds.** *Journal of Visualized Experiments*, n.119, p.1–5, 2017.

HUTCHINSON C. R. **Microbial polyketide synthases: More and more prolific.** School of Pharmacy and Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 3336–3338, March 1999

IGUCHI A, IWANAGA S, NAGAI H. **Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(1):107–12

KIKUCHI RK, OLIVEIRA MD, LEÃO ZM, SILVA RM, MARTINS PM. **Os recifes de Tinharé-Boipeba-Camamu, Bahia. In Rio Oil & Gas Expo and Conference Proceedings of Rio Oil and Gas Expo and Conference.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis; 2008. pp. 1–8.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. **A nonribosomal system of peptide biosynthesis** *European Journal of Biochemistry*, 1996.

KONZ, D.; MARAHIEL, M. A. **How do peptide synthetases generate structural diversity?** *Chemistry & biology*, v. 6, n. 2, p. R39 – R48, 1999.

LABOREL, J. **A revised list of Brazilian scleractinian corals and description of a new species.** 1967.

LABOREL, J. **Madréporaires et hydrocoralliaires récifaux des cotes brésiliennes: systématique, écologie, répartition verticale et géographique.** Masson, 1969.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing 1991.** In: JOHN WILEY AND SONS (Ed.). *Stackebrand E & Goodfellow M (Ed.). Nucleic acid ed.* New York: [s.n.], p. 115–147.

LEWIS JB. **Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs.** *Adv Mar Biol*. 2006; 50:1–55. Doi: 10.1016/S0065-2881(05)50001-4.

LI, Y.; WEISSMAN, K. J.; MULLER, R. **Insights into multienzyme docking in hybrid PKS-NRPS megasynthetases revealed by heterologous expression and genetic engineering.** ChemBioChem 2010, 11, 1069. IN GONZÁLEZ G. D. T., SIGRIST R. PAULO B. S. **Avanços Recentes na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais.** Revista Virtual de Química. Volume 8, Número 6. Novembro-Dezembro 2016. ISSN 1984-6835.

LIMA, L. et. al.. **Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Brazilian CoastCoralPhyllogorgiadilatata.** Protein & Peptide Letters, v.20, n.10, p.1153–1158,13ago.2013.

MACEDO, Maria Wanna. **Microbiota associada aos cnidários *Millepora alcicornis* e *Phyllogorgia dilatata*: diversidade microbiana e prospecção de moléculas ativas.** 2020. Folhas. Dissertação de mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília–DF, 2020.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.) **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Brasília (DF): MMA; Belo Horizonte (MG): Fundação Biodiversitas, 2008.

MADIGAN, M. T. et. al.. **Microbiologia de Brock.** 14^a edição ed. Porto alegre: Artmed, 2016.

MANAR E. S., SAMAR M. S., AMRO H. **Atividade antimicrobiana de bactérias isoladas de invertebrados marinhos do Mar Vermelho,** Relatórios de Biotecnologia, 10.1016/j.btre.2018.e 00275, 19, (e00275), (2018).

MATTHEWS JL, RAINA JB, KAHLKE T, SEYMOUR JR, VAN OPPEN MJH, SUGGETT DJ. **Symbiodiniaceae-bacteria interactions: rethinking metabolite exchange in reef-building corals as multi-partner metabolic networks.** Environ Microbiol. 2020 May;22(5):1675-1687. doi: 10.1111/1462-2920.14918. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31943674.

METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. **Plant behavioural ecology: Dynamic plasticity in secondary metabolites.** Plant, Cell and Environment, v. 32, n. 6, p. 641–653,2009.

MOATS W. E. **Fire coral envenomation.** J Wilderness Med. 1992; 3(3):284–287. doi: 10.1580/0953-9859-3.3.284.

MOHR W, INTERMAGGIO MP, LAROCHE J (2010) **Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH8501.** Environ Microbiol 12: 412–421.

MOURA, R.; AMADO-FILHO, G.; MORAES, F.; BRASILEIRO, P.; SALOMON, P.; MAHIQUES, M.; & BRITO, F. **An extensive reef system at the Amazon River mouth.** Science advances, v. 2, n. 4, p. e1501252, 2016.

MOURA S. R.; REZENDE R. P.; MARQUES E. L. S.; CARVALHO N. M.; MACIEL B. M. **Screening of *Bacillus* sp. isolated from coral *Siderastrea stellata* for antimicrobial**

activity against enteropathogenic strains of Salmonella and Escherichia coli. Brazilian Journal of Development ISSN: 2525-8761 3385 Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.1, p. 3385-3397 jan. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n1-228.

MUNN, C. B. Marine microbiology: ecology & applications. Londres: **BIOS Scientific Publishers**, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICOLAOU, K. C., ROSCHANGAR, F. & VOURLOUMIS, D. **Angew.** 1998. Chem. Int. Ed. 37, 2014–2045.

NISSIMOV J, ROSENBERG E, MUNN C. **Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of Oculina patagônica.** 2009. FEMS Microbiol Lett 292, 210–215 <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01490.x>

O’CONNOR, S. E. Engineering of Secondary Metabolism. **Annual Review of Genetics**, v. 49, n. 1, p. 71–94, 2015.

OLIVEIRA, M. D. M.; LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P. **Cultivo de Millepora alcicornis como uma ferramenta para Restauração e Manejo dos Nacional**, 2016.

OLSON J. B.; MCCARTHY P. J. Associated bacterial communities of two deep-water sponges. **Aquatic microbial ecology aquat microb ecol** v. 39 p. 47–55, 2005.

OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 10, p. 449–457, 2010.

PIRES D, DE PAULA, FERREIRA B, FRANCINI-FILHO R, GASPAR A, MENDES L, NEGRÃO F, *et. al.*. **Mussismilia harttii** (Verrill, 1868) In: ICMBio (eds). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2018. pp 660–664.

PIRES D. O., CASTRO C. B., and RATTO C. C. "**Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: the endemic genus Mussismilia.**" *Marine Biology* 1353 (1999): 463–471.

RAHMAN, H. *et. al.*. **Novel anti-infective compounds from marine bacteria.** *Marine Drugs*, v. 8, n. 3, p. 498–518, 2010.

Raimundo, SG Silva, R Costa, T Keller-Costa. **Marine drugs** 2018. 16 (12), 485, 45.

RAINA, J. B. *et. al.*. **Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals.** *PeerJ*, v. 2016, n. 8, 2016.

REBELLO, F. D. F. P.; GASPAR, A. Microorganismos e seus metabólitos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Agrogeoambiental**, p. 135–142, 2010.

RICHARDSON L., GRAHAM N. A. J., HOEY A. S. **Coral species composition drives key**

ecosystem function on coral reefs. Proc Biol Sci. 2020 Feb 26; 287 (1921):20192214. Doi: 10.1098/rspb.2019.2214. Epub 2020 Feb 19.

RODRIGUES, J. M. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Formadoras de Endósporos Isoladas e Identificadas de Amostras Marinhas. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas, da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí**, 2008.

ROGERS R, DE OLIVEIRA CORREAL G, DE OLIVEIRA TC, DE CARVALHO LL, MAZUREK P, BARBOSA JE, *et. al.*. **Coral health rapid assessment in marginal reef sites.** *Mar Biol Res.* 2014;10(6): 612–24.

ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R., ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease, A reand evolution. **NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY.** v.5, p.355-362, 2007.

SAHM B. D.B. **Prospecção de substâncias com potencial anticâncer em Microrganismos associados ao zoantídeo *Protopalythoa variabilis*** (Cnidaria, Anthozoa). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Fortaleza. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará.

SEYEDSAYAMDOST, M. R. Toward a global picture of bacterial secondary metabolism. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3–4,p. 301–311, 29 mar. 2019.

SILVEIRA C. B. *et. al.* **Bacterial Community Associated with the Reef Coral *Mussismilia braziliensis*'s Momentum Boundary Layer over a Diel Cycle.** *Frontiers in Microbiology.* May 2017. Volume 8. Article 784. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00784.

SHIOMI K, HOSAKA M, YANAIKE N, YAMANAKA H, KIKUCHI T. **Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*.** *Nippon Suisan Gakk.* 1989;55(2):357–62.

SHNIT-ORLAND M, KUSHMARO A. **Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense.** 2009. *FEMS Microbiology Ecology*, V 67, Issue 3, Pages 371–380 <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00644>.

SOUSA F, MOURA S, QUINTO C, PIROVANI C, REZENDE R. **Functional screening for cellulolytic activity in a metagenomic fosmid library of microorganisms associated with coral.** 2016. *Genetics and Molecular Research* 15:1-8, n.2016 <http://doi.org/0.4238/gmr.15048770>.

SOUZA, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de líquidos metabólicos e extratos miceliais de fungos marinhos isolados de corais.** 2017. Programa de Pós-graduação em Saúde humana e meio ambiente PPGSHMA. UFP. Vitória de Santo Antão, 54 folhas.

STROHL, W. R. **Biotechnology of Antibiotics.** 1997. ed. Strohl, W. R. Marcel Dekker, New York, pp. 1–48.

SUGGETT, D.; KIKUCHI, R.; OLIVEIRA, M.; SPANÓ, S.; CARVALHO, R.; & SMITH, D. **Photobiology of corals from Brazil's near-shore marginal reefs of Abrolhos.** *Marine Biology*, v. 159, n. 7, p. 1461-1473, 2012.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia.** 12ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2010.

THOMPSON, F. L.; ILDA, T.; J. **Biodiversity of vibrios.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n. 68, p. 403-431, 2004.

THOMPSON FL, D GEVERS, CC THOMPSON, P DAWYNDT, S NASER, B HOSTE, CB MUNN & J SWINGS. 2005. **Filogenia e identificação molecular de vibrios com base na análise de sequência multilocus.** *Microbiologia Aplicada e Ambiental* 71: 5107-5115.

TRINDADE M., SITHOLE N., KUBICKI S., THIES S., BURGER A. (2021) **Estratégias de Triagem para Descoberta Bio surfactante. Em: Avanços em Engenharia. Bioquímica/Biotecnologia.** Springer, Berlim, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2021_174.

VILELA C. L. S., et. al. **Exploring the Diversity and Biotechnological Potential of Cultured and Uncultured Coral-Associated Bacteria.** *Microorganisms* 2021, 9, 2235. <https://www.mdpi.com/journal/microorganisms>.

VILLELA H. **Microbiome Flexibility Provides New Perspectives in Coral Research.** *BioEssays. Volume 42. Edição 7.* Julho de 2020. <https://doi.org/10.1002/bies.202000088>

VOOLSTRA C. R., ZIEGLER M. **Adapting with Microbial Help: Microbiome Flexibility Facilitates Rapid Responses to Environmental Change.** 2020. *BioEssays.* <https://doi.org/10.1002/bies.202000004>

XINGHAI Z., et. al.. **A Genome-Wide Association Study Identifica Genes Candidatos Associados à Cor Shell na Baía Scallop *Argopecten irradians*,** *Frontiers in Marine Science*, 10.3389/fmars.2021.742330, **8**, (2021).

WANG, S.; LU, Z. **Secondary Metabolites in Archaea and Extreme Environments.** **Springer International Publishing**, v. *Biocommuni*, p. 1–324, 2017.

WATER V., ALLEMAND D., FERRIER-PAGÈS C. **Interações hospedeiro-micróbio em holobionts octocorais — Avanços e perspectivas recentes.** *Microbiome.* 2018. Doi: 10.1186 / s40168-018-0431-6.

WEBER, G. et. al.. **The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame.** *Current Genetics* 1994, 26, 120. IN GONZÁLEZ G. D. T., SIGRIST R. PAULO B. S. **Avanços Recentes na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais.** *Revista Virtual de Química. Volume 8, Número 6.* Novembro-Dezembro 2016. ISSN 1984-6835 1999

WITTLE LW, MIDDLEBROOK R, LANE C. **Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis***. *Toxicon*. 1971;9(4):327–31

WITTLE LW, WHEELER CA. **Toxic and immunological properties of stinging coral toxin**. *Toxicon*. 1974;12(5):487–93. doi:10.1016/0041-0101(74)90038-5.

ZILBERBERG C, PELUSO L, MARQUES JA, CUNHA H. **Polymorphic microsatellite loci for endemic *Mussismilia* corals (Anthozoa: Scleractinia) of the southwest Atlantic Ocean**. *J Hered*. 2014;105(4): 572–5. 10.1093/jhered/esu023

APENDICE

Apêndice 1 – Tabela com a descrição dos Isolados encontrados no meios de cultura Marinho

Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados	Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados
AHM 01	RB1 D0A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 01	Diluição 0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 02	RB2 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilo Médios	APM 02	RB1 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 03	RB2 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 03	RB2 D2A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 04	RB3 D0A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 04	RB2 D2A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 05	Diluição 3	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APM 05	RB3 D1A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 06	RB1 D0B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APM 06	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 07	Diluição 1	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 07	RB3 D1A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 08	RB2 D1A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 08	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Médios
AHM 09	RB2 D1A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 09	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 10	Diluição 1	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 10	RB1 D1B	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 11	RB3 D3A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APM 11	RB2 D1B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 12	RB1 D0A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APM 12	RB2 D1B	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 13	Diluição 1	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 13	Diluição 0	Colônia pequena, circular, plana, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, seca.	Bacilos Pq.
AHM 14	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 14	Diluição 0	Colônia média, circular, plana, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Médios
AHM 15	Diluição 0	Colônia média, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 15	RB2 D2A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 16	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 16	RB2 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 17	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 17	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 18	Diluição 0	Tapete, branca, cremosa, lisa.	Bacilos Pq.	APM 18	Diluição 2	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 19	Diluição 2	Colônia pequena, circular, borda lisa, Bege, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 19	RB3 D1A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 20	RB2 D3B	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 20	Diluição 0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.

AHM 21	Diluição 1	Tapete, marrom, cremosa, lisa.	Bacilos Pq.	APM 21	RB2 D2A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 22	Diluição 1	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 22	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 23	Diluição 1	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 23	RB2 D1B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 24	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 24	RB2 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 25	RB1 D0B	Tapete, marrom, cremosa, lisa.	Bacilos Pq.	APM 25	RB2 D2A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Médios
AHM 26	RB2 D0A	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 26	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, opaca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 27	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos Pq.	APM 27	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Médios
AHM 28	Diluição 1	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos Pq.				
AHM 30	RB1 D2B	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos pq	Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados
AHM 31	RB1 D2B	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos pq	AMM 01	RB1 D2B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 32	Diluição 1	Colônia média, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos pq	AMM 02	RB3 D3A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 33	RB2 D01	Colônia pequena, circular, borda lisa, marrom, cremosa.	Bacilos pq	AMM 03	RB1 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Coco Pq.
AHM 34	Diluição 0	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos pq	AMM 04	RB1 D2B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Coco Pq.
AHM 35	Diluição 1	Tapete, branca, lisa, cremosa.	Bacilos pq	AMM 05	RB1 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHM 36	RB2 D2A	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos pq.	AMM 06	RB1 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
				AMM 07	RB1 D1B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Coco Pq.
Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados	AMM 08	RB1 D1A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 01	RB3 D3B	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMM 09	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 02	RB3 D3A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Médios	AMM 10	RB3 D1A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 03	RB3 D3A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMM 11	RB3 D1A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 04	RB3 D3A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMM 12	RB1 D0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.

MhM 05	Diluição 1	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 13	RB1 D0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas irregulares, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 06	RB1 D3A	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 14	RB1 D3A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 07	RB2 D2A	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 15	RB1 D3A	Colônia pequena, pontiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 08	RB2 D2A	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 16	RB1 D2B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 09	RB1 D0B	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 17	RB2 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 10	Diluição 0	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 18	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 11	RB1 D0B	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 19	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas irregulares, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 12	RB3 D1A	Tapete, branca, circular, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 20	RB3 D2A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 13	Diluição 2	Colônia pequena, circular, marrom, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 21	Diluição 2	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 14	RB2 D0A	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Médios	AMM 22	RB1 D3A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 15	RB1 D3A	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 23	RB1 D1B	Colônia pequena, pontiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Cocos Pq.
MhM 16	Diluição 1	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 24	Diluição 3	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 17	RB2 D0A	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 25	Diluição 3	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 18	RB3 D2A	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Pq.	AMM 26	RB3 D3A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 19	Diluição 0	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Médios	AMM 27	RB1 D2A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
MhM 20	Diluição 0	Colônia pequena, circular, branca, lisa, cremosa.	Bacilos Médios	AMM 28	Diluição 3	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
				AMM 29	Diluição 3	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.

Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados	Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados
MaM 01	RB1 D3B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 02	Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	PdM 01	RB1 D1B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
MaM 03	RB2 D2A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	PdM 02	RB2 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
MaM 04	RB1 D3B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 05	RB1 D3B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 06	RB2 D2A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 07	RB3 D1A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 08	RB2 D1B	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
MaM 09	RB1 D0A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				

Apêndice 2 – Tabela com a descrição dos Isolados encontrados no meio de cultura SWA

Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia do Isolado	Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados
AHA 01	RB2 D1B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, seca.	Bacilos Pq.	AMA 01	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 02	RB1 D0A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 02	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 03	RB1 D0A	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 03	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 04	RB3 D0A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 04	RB1 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 05	Água Diluição 3	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 05	Diluição 0	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, transparente, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 06	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 06	RB1 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 07	RB1 D0A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 07	RB3 D3A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 08	RB1 D0A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 08	RB1 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 09	RB2 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 09	RB1 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 10	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, seca.	Bacilos Pq.	AMA 10	RB1 D2B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 11	RB1 D0B	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 11	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 12	RB1D0B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 12	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 13	RB3 D3B	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 13	RB1 D0	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.

AHA 14	RB3 D2B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 14	RB3 D3B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Médios
AHA 15	Diluição 3	Colônia pequena, plana, lisa, amarela, cremosa.		AMA 15	Água D0	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 16	Diluição 1	Colônia pequena, circular, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 16	RB3 D2A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 17	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	AMA 17	RB3 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 18	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.				
AHA 19	RB3 D0A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Médios	Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados
AHA 21	Diluição 1	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.	APA 01	Água Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 23	RB1 D0A	Colônia pequena, circular, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APA 02	RB3 D1A	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.
AHA 24	RB3 D2A	Colônia pequena, circular, borda lisa, branca, cremosa.	Bacilos Pq.	APA 03	RB2 D2A	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida	Bacilos Pq.
AHA 25	RB3 D2C	Colônia pequena, circular, borda lisa, Marrom, cremosa.	Bacilos Pq.	APA 04	RB1 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
				APA 05	RB2 D2A	Colônia pequena, circular, plana, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
Isolado	Diluição	Morfologia das Colônias	Morfologia dos Isolados	APA 06	RB2 D1B	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida	Bacilos Pq.
PdA 01	CORAL	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, transparente, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APA 07	Água Diluição 0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Pq.
PdA 02	CORAL	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Médios	APA 08	Diluição 2	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, amarela, úmida.	Bacilos Pq.
PdA 03	CORAL	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Médios	APA 09	Água Diluição 0	Colônia média, circular, elevada, bordas irregulares, lisa, opaca, rosa, úmida.	Bacilos Pq.
				APA 10	Água Diluição 0	Colônia pequena, circular, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, amarela, úmida.	Bacilos Médios
Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados	APA 11	Água Diluição 0	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, opaca, branca, úmida.	Bacilos Médios
MhA 01	CORAL	Colônia média, circular, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.	APA 12	Água Diluição 0	Colônia pequena, circular, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, rosa, úmida.	Bacilos Pq.
MhA 02	CORAL	Colônia pequena, puntiforme, plana, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Médios				
Isolado	Diluição	Morfotipo das Colônias	Morfologia dos Isolados				
MaA 01	CORAL	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.				
MaA 02	CORAL	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.				
MaA 03	CORAL	Colônia pequena, puntiforme, elevada, bordas lisas, lisa, translúcida, branca, úmida.	Bacilos Pq.				

Identificação dos isolados de *M. Alcornis*; *M. hartii* e *P. dilatata* que apresentaram Atividade Antimicrobiana

Apêndice 3 - Tabela de classificação filogenética dos isolados bacterianos de *M. alcornis*, *M. hartii* e *P. Dilatata* que apresentaram atividade antimicrobiana. A tabela mostra o grau de confiança de cada grupo taxonômico.

ISOLADOS CORAIS							
Isolado	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	pb
MHM 01	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Catenococcus [93%]	640
PdM 01	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	Bacilli [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae 1 [100%]	Bacillus [100%]	570
MHM 13	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	600
PdA02	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	Bacilli [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae 1 [100%]	Bacillus [100%]	630

ISOLADOS ÁGUA DO CORAL

Isolado	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	pb
AHA 24	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Catenococcus [90%]	620
AMM 07	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Alteromonadales [100%]	Idiomarinaceae [100%]	Idiomarina [100%]	640
AMM 13	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	530
AMM 16	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	630
AMM 17	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	670
AMM 18	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	710
AMM 19	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	570
AMM 20	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	590

AMM 21	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	490
AMM 22	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	530
AMA 01	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	Bacilli [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [100%]	Bacillus [100%]	450
APA 01	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Vibrionales [100%]	Vibrionaceae [100%]	Vibrio [100%]	610
APA 03	Bacteria [100%]	Firmicutes [100%]	Bacilli [100%]	Bacillales [100%]	Bacillaceae [99%]	Bacillus [90%]	650
APA 04	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Alteromonadales [100%]	Pseudoalteromonadaceae [100%]	Pseudoalteromonas [100%]	700
APA 05	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Alteromonadales [100%]	Idiomarinaceae [100%]	Idiomarina [100%]	610
APA 06	Bacteria [100%]	Proteobacteria [100%]	Gammaproteobacteria [100%]	Oceanospirillales [100%]	Halomonadaceae [100%]	Halomonas [100%]	700

Apêndice 4 – Tabela de resumo dos resultados das atividades testadas para os 182 Isolados das três espécies de Corais: *M. alcornis*; *M. hartii* e *P. dilatata*.

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade Antimicrobiana		Meio de cultura NA e LB
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KSα/KSβ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
AHA 01	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 02	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 03	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 04	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 05	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 06	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 07	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 08	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 09	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 10	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 11	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 12	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 13	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AHA 14	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHA 15	+	+	+	-	-	-	-	Todos
AHA 16	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 17	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 18	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 19	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 21	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHA 23	+	+	+	-	-	-	-	Todos
AHA 24	+	-	+	-	-	+	-	LB
AHA 25	+	-	+	-	-	-	-	Todos

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade antimicrobiana		Meio de cultura LB; NA; TSA; MA NA
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KS α /KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
AMA 01	+	-	-	-	+	+	+	NA
AMA 02	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMA 03	+	+	-	-	-	-	-	Todos
AMA 04	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 05	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 06	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 07	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMA 08	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 09	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AMA 10	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AMA 11	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 12	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 13	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 14	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AMA 15	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMA 16	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMA 17	+	-	-	-	+	-	-	Todos

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade antimicrobiana		Meio de cultura LB; NA; TSA; MA NA
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KS α /KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
APA 01	+	-	-	-	-	-	+	NA
APA 02	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APA 03	+	-	-	-	+	-	+	NA
APA 04	+	-	+	-	-	-	+	NA
APA 05	+	-	+	-	+	-	+	NA
APA 06	+	-	-	-	-	-	+	NA
APA 07	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APA 08	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APA 09	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APA 10	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APA 11	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APA 12	+	-	-	-	-	-	-	Todos

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade antimicrobiana		Meio de cultura LB; NA; TSA; MA
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KS α /KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
AHM 01	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AHM 02	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 03	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AHM 04	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AHM 05	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AHM 06	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AHM 07	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AHM 08	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHM 09	+	-	+	-	-	-	-	Todos
AHM 10	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 11	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 12	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 13	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 14	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 15	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 16	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 17	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 18	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 19	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 20	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 21	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 22	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 23	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 24	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 25	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 26	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 27	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 28	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 30	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 31	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 32	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 33	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 34	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 35	+	-	-	-	-	-	-	Todos
AHM 36	+	-	-	-	-	-	-	Todos

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade antimicrobiana		Meio de cultura LB; NA; TSA; MA
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KS α /KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
AMM 01	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 02	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 03	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 04	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 05	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 06	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 07	+	-	-	-	+	+	+	LB
AMM 08	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMM 09	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 10	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 11	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 12	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 13	+	-	-	-	+	-	+	NA
AMM 14	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMM 15	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMM 16	+	-	+	-	+	-	+	NA
AMM 17	+	-	+	-	+	-	+	NA
AMM 18	+	-	+	-	+	-	+	NA
AMM 19	+	-	+	-	+	+	+	NA
AMM 20	+	-	+	-	+	+	+	NA
AMM 21	+	-	+	-	+	+	+	NA
AMM 22	+	-	+	-	+	+	+	NA
AMM 23	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 24	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 25	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 26	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 27	+	-	-	-	+	-	-	Todos
AMM 28	+	-	+	-	+	-	-	Todos
AMM 29	+	-	+	-	+	-	-	Todos

Identif. Isolado Água	Amplificação dos Primers					Atividade antimicrobiana		Meio de cultura LB; NA; TSA; MA
	16S	A3F/A7R	PSF/R	DKF/R	KS α /KS β	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
APM 01	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 02	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 03	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 04	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APM 05	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APM 06	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APM 07	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 08	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 09	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 10	+	-	+	-	-	-	-	Todos
APM 11	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 12	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 13	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 14	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 15	+	-	-	-	+	-	-	Todos
APM 16	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 17	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 18	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 19	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 20	+	-	-	-	-	-	-	Todos
APM 21	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 22	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 23	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 24	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 25	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 26	+	-	+	-	+	-	-	Todos
APM 27	+	-	-	-	+	-	-	Todos