

Identificação de bactérias associadas à *Aplysina caissara* e rastreio do seu potencial antimicrobiano.

LUIZA PORTEIRO CARMINATO

São Vicente - SP

2021

Identificação de bactérias associadas à *Aplysina caissara* e rastreio do potencial antimicrobiano.

LUIZA PORTEIRO CARMINATO

ORIENTADORA: DRA CRISTIANE CASSIOLATO PIRES HARDOIM

COORIENTADOR: DR WAGNER VILEGAS

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Banca Examinadora para obtenção de grau em bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha.

São Vicente - SP

2021

*O manuscrito foi formatado segundo a revista: *Frontiers in Microbiology*.

Normas da revista disponíveis em: <https://www.frontiersin.org/about/author-guidelines#Sections>

C287i Carminato, Luiza Porteiro
Identificação de bactérias associadas à *Aplysina caissara* e rastreio do seu potencial antimicrobiano. / Luiza Porteiro Carminato. -- São Vicente, 2021
40 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Cassiolato Pires Hardoim
Coorientador: Wagner Vilegas

1. Esponja. 2. Bactérias. 3. Biodiversidade marinha. 4. Compostos bioativos. 5. Produtos naturais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Sumário

Abstract.....	1
Resumo	2
1. Introdução.....	3
2. Materias e Métodos	5
2.1. Coleta e preparação de estirpe	5
2.2. Isolamento e identificação de bactérias associadas à <i>A. caissara</i>	5
2.3. Estrutura das bactérias associadas à <i>A. caissara</i>	6
3. Resultados	7
3.1. Identificação bacteriana	7
3.2. Teste SAM	20
4. Discussão.....	27
Agradecimentos	30
Referências	30

Identificação de bactérias associadas à *Aplysina caissara* e rastreio do seu potencial antimicrobiano.

Luiza Porteiro Carminato¹, Andressa Cristina Motta Ramaglia¹, Carolina Costa Mendes¹, Letícia Rojas Sanfillippo¹, Gisele Lôbo-Hajdu², Márcio Reis Custódio³, Cristiane Hardoim^{1*}

¹Laboratório de Interações Hospedeiro-Microbiota, Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 11330-900 – São Vicente – SP, Brasil

²Departamento de Genética, Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

³Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia e Centro de Biologia Marinha, NP-Biomar, Universidade de São Paulo (USP) São Paulo, Brasil.

*** Correspondence:**

Cristiane Hardoim, e-mail: cristianehardoim@gmail.com

Keywords: Porifera; sponge-associated bacteria; microbial diversity; bioactive compounds; natural marine products.

Abstract

Sponges are marine animals known to be a rich source of bioactive compounds. Most of these substances from sponges are actually synthesized by microorganisms associated with them. Sponges of the family Aplysinidae have a highly diversity associated microbiota, with an enormous potential for the discovery of new bioactive substances. In this context, this study aimed to identify the bacteria associated with *Aplysina caissara* (an endemic species from the coast of São Paulo) and analyze their antimicrobial-producing capacity. To this end, the bacteria isolated from *A. caissara* were identified by the sequencing of the 16S rRNA gene. Additionally, their bioactive potential was investigated, where four strains of clinical interest to know: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecium* (ATCC 19434) were used. The culture media used for this were (i) Brain-Heart Infusion (BHI) e (ii) R2A. In total, 63 isolates from *A. caissara* were obtained and they were affiliated to the phyla *Actinobacteria* (*Micrococcus* and *Brevibacterium*), *Bacteroidetes* (*Aquimarina*, *Aureiviga*, *Flavobacteriaceae* and *Tenacibaculum*), *Firmicutes* (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Oceanibacillus*, *Tenacibaculum* and *Staphylococcus*) and *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* - *Acinetobacter*; and, *Gammaproteobacteria* - *Pseudovibrio* and *Vibrio*). Additionally, some strains could not be classified according to several databanks, potentially indicating that these belong to new genera and species. Of these, 29 isolates from *A. caissara* demonstrated inhibitory activities for at least one of the indicator strains in one of the tested media. With increasing resistance to existing antibiotics, a search for new natural products with antimicrobial capacity is of utmost medical importance. Thus, *A. caissara* species proved to be an interesting study model, with potential for the discovery of new bacteria as well as new drugs.

Resumo

As esponjas são animais marinhos conhecidos por serem uma rica fonte de compostos bioativos. Parte dessas substâncias providas de esponjas são, na realidade, sintetizadas por microrganismos que vivem em associação com a mesma. Esponjas da família Aplysiniidae apresentam uma grande diversidade em sua microbiota, contendo um enorme potencial para a descoberta de novas substâncias. Nesse âmbito, o presente trabalho teve como objetivo identificar a microbiota cultivável associada à *Aplysina caissara* (espécie endêmica do litoral de São Paulo) e, analisar a sua capacidade produtora de antimicrobianos. Para isso, os microrganismos foram isolados da hospedeira, identificados por sequenciamento do gene codificado do 16S rRNA e submetidos a um duplo teste de produção de substâncias antimicrobianas (SAM) em placas com ágar contra quatro estirpes indicadoras de interesse clínico: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecium* (ATCC 19434). Os meios de cultivo utilizados para essa finalidade foram (i) Infusão Cérebro-Coração (BHI, em inglês “Brain Heart Infusion”) e (ii) R2A. Ao todo, foram obtidos 63 isolados de *A. caissara*, com representantes dos filos *Actinobacteria* (*Micrococcus* e *Brevibacterium*), *Bacteroidetes* (*Aquimarina*, *Aureiviga*, *Flavobacteriaceae* e *Tenacibaculum*), *Firmicutes* (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*) e *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* – *Acinetobacter*; e, *Gammaproteobacteria* - *Pseudovibrio* e *Vibrio*). Algumas estirpes não foram classificadas de acordo com diversos bancos de dados, o que potencialmente indica que estas pertencem a novos gêneros e espécies. Destas, 29 estirpes demonstraram ação inibitória para pelo menos uma das estirpes indicadoras em um dos meios testados. Com o aumento de resistência aos antibióticos existentes, a pesquisa de novos produtos naturais com capacidade antimicrobiana é de extrema importância médica. Assim, a espécie *A. caissara* se mostrou um interessante modelo de estudo, com potencial para a descoberta de novos microrganismos e, desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chaves: Porífera; bactérias associadas à esponja; diversidade microbiana; compostos bioativos; produtos naturais marinhos.

1. Introdução

O filo Porifera contém os animais conhecidos como esponjas. Elas são sésseis, filtradoras, um dos mais antigos metazoários e são divididos em quatro classes: Demospongiae, Hexactinellida, Calcarea e Homoscleromorpha (Love et al., 2009; Gazave et al., 2012; Wörheide et al., 2012; Zumberge et al., 2018; Van Soest et al., 2021). As esponjas são conhecidas como uma fonte de produtos naturais de relevância farmacêutica, apresentando um enorme potencial biotecnológico. Dentre os invertebrados marinhos, as esponjas são os animais que proporcionam um maior número de produtos naturais, tendo a maior diversidade de metabólitos secundários que já foram isolados e descritos como produtos naturais marinhos (Carroll et al., 2019). Vários estudos relataram essa bioatividade provinda de substâncias isoladas das esponjas, incluindo propriedades antitumorais (Simmons et al., 2005), antivirais (Esteves et al., 2011), antimicrobianas (Indraningrat et al., 2016) e citotóxicas gerais (Wang, 2006). Embora alguns desses produtos sejam genuinamente sintetizados pelo próprio animal (Otero-González et al., 2010), como é o caso do Manolide, um bloqueador dos canais de cálcio que possui efeito antibiótico, analgésico e anti-inflamatório isolado da esponja marinha *Luffariella variabilis* (de Silva and Scheuer, 1980). As esponjas são assim, importantes fontes de novos compostos de interesse clínico tal como, alcalóides com atividade antibacteriana como por exemplo, axinelaminas B-D, providas de *Axinella* sp., e petrosamina B, proveniente de uma espécie de *Oceanapia* (Golfo de Carpentaria, Austrália), que apresentam atividade bactericida contra *Helicobacter pylori*, bactéria Gram-negativo associada à úlcera péptica e câncer gástrico (Laport et al., 2009).

Evidências demonstram que certos compostos advindos de esponjas marinhas são na verdade, sintetizados por microrganismos que vivem em associação com esses animais (Tae and Fuerst, 2006; Hardoim et al., 2009; Li, 2009; Zhang et al., 2009a, 2009b; Waters et al., 2014; Wilson et al., 2014). Diferentes Lipopeptídeos antimicrobianos, como surfactina, iturin, fengycina e pumilacidina, são exemplos de compostos identificados produzidos por isolados bacterianos do gênero *Bacillus*, provenientes da esponja marinha *Aplysina aerophoba*. Compostos desta classe são importantes pois podem apresentar um largo espectro de ação contra diversas bactérias como *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Vibrio* sp, *Clavibacter michiganensis*, *Bacillus megaterium*, *Proteus vulgaris* e *Agrobacterium tumefaciens* tal qual, contra fungos como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Paecilomyces variotii* (Pabel et al., 2003, Laport et al., 2009).

Esses microrganismos simbiotes são adquiridos por transmissão vertical (por exemplo, por meio de gêmulas) ou do ambiente circundante por transmissão horizontal (Schmitt et al., 2008; Sipkema et al., 2015). Para o último modo de aquisição de simbiote, é necessário um reconhecimento celular que discrimine os microrganismos simbiotes daqueles não simbióticos (Díez-Vives et al., 2017). As bactérias simbiotes podem ser diferenciadas do alimento através do reconhecimento específico das mesmas pelas esponjas ou, pela presença de fatores de mascaramento extracelulares que algumas bactérias utilizam para evitar sua detecção pelas células das esponjas (Nguyen et al., 2014). Por serem filtradores potentes, à medida que a água é bombeada através da matriz porosa da esponja, a maioria dos microrganismos nela contidos é filtrada e absorvida pelos seus coanócitos que, juntamente com os amebócitos, realizam a fagocitose na esponja (Wehrli et al., 2007). Desse modo, enquanto algumas bactérias são imediatamente digeridas, outras podem passar pela esponja sem serem processadas e assim, permanecerem na esponja por muito tempo (Hentschel et al., 2003). No geral, a associação entre esponjas e microrganismos depende da capacidade destes em resistir ao processo digestório e a resposta imune das esponjas (Wilkinson, 1987), podendo-se estabelecer diferentes relações, desde parasitárias até simbióticas (Dharmaraj et al., 2010).

Assim, as esponjas são capazes de hospedar uma grande e diversa comunidade de microrganismos, que compõem uma porcentagem significativa de até 40% de sua biomassa (Vacelet e Donadey, 1977; Taylor et al., 2007). Esponjas que contém um grande número de

bactérias extracelulares são chamadas "esponjas com alta abundância microbiana" (*High microbial abundance* - HMA) (Vacelet e Donadey, 1977; Hentschel et al., 2003) pertencentes, em sua maior parte, a classe Demospongiae. Além da alta diversidade de microrganismos associados à esponja, há um enriquecimento aparente desses simbiontes (Simister et al., 2012; Taylor et al., 2013).

A atividade bioativa e a função que esses microrganismos desempenham podem ser analisadas através de culturas que permitem isolar bactérias associadas às esponjas. O cultivo desses microrganismos é uma ferramenta importante para estudar a fisiologia e a função ecológica dos mesmos (Stewart, 2012), pois pode fornecer acesso a bactérias que não puderam ser detectadas com abordagens moleculares (Donachie et al., 2007; Shade et al., 2012; Hardoim et al., 2014). Contudo, essa técnica apresenta algumas limitações, uma vez que muitas bactérias abundantes no ambiente marinho não são facilmente cultivadas por procedimentos microbiológicos padrão (Joint et al., 2010) e, por isso, busca-se a diversificação dos métodos de cultivo para alcançar uma cultivabilidade melhorada das bactérias alvo (Sipkema et al., 2011; Esteves et al., 2016).

Embora haja uma grande diversidade e um amplo potencial para a descoberta de novos compostos bioativos, há poucos estudos sobre a microbiota de esponjas na costa brasileira (Hardoim et al., 2009; Santos et al., 2010, 2015; Trindade-Silva et al., 2012). Faltam informações principalmente sobre espécies endêmicas, como a *Aplysina caissara* (Demospongiae, Aplysinidae, Pinheiro e Hajdu, 2001, Pinheiro et al., 2007), encontrada no litoral de São Paulo. Essa espécie tem sido alvo de pesquisadores por ser fonte de uma variedade de peptídeos e alcalóides biologicamente ativos (Saeki et al., 2002; Lira et al., 2006). Ela distingue-se de todas as outras espécies de sua família, conhecidas do Atlântico ocidental tropical, por apresentar cor amarelo brilhante, pequenos dígitos eretos com ósculos apicais e, por possuir reticulação bastante delicada (Pinheiro e Hajdu, 2001). Quanto a sua diversidade, estudos recentes mostraram que *A. caissara* coletada em dois locais da costa de São Sebastião (São Paulo) possui entre 34 e 37 filos bacterianos (Hardoim et al., 2021a, 2021b). Por causa da sua abundância e diversidade microbiana, a *A. caissara* possui um potencial ainda pouco explorado para a descoberta de novos produtos naturais.

O estudo e o cultivo da microbiota associada às esponjas endêmicas e, aquelas ainda pouco conhecidas, é de extrema importância para a produção de novos compostos bioativos, principalmente aqueles com atuação antimicrobiana, capazes de combater o crescimento de bactérias patogênicas que adquiriram resistência aos antibióticos existentes. A resistência antimicrobiana (AMR) é uma ameaça global emergente, diminuindo as possibilidades de prevenção e tratamento de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, parasitas e fungos. Os microrganismos associados à esponja oferecem um enorme potencial como fonte de substâncias antimicrobianas, conforme demonstrado por muitos isolados microbianos que inibem as estirpes patogênicas *in vitro* e sintetizam substâncias ativas contra vários grupos de agentes infecciosos (Indraningrat et al., 2016). Com base em estudos anteriores (Shigemori et al., 1992; Kobayashi e Ishibashi, 1993; Unson et al., 1994; Tae e Fuerst, 2006; Hardoim et al., 2009; Li, 2009; Zhang et al., 2009a, 2009b; Waters et al., 2014; Wilson et al., 2014), estima-se que, ao isolar e cultivar as bactérias associadas à *Aplysina caissara*, será formada uma comunidade complexa e diversa cujas atividades antagonistas desempenhadas pelas estirpes bacterianas terão um largo espectro de ação. Neste contexto, este trabalho visa avaliar a diversidade e composição da comunidade bacteriana de *A. caissara*, isolando a comunidade bacteriana nela associada, identificando as estirpes bacterianas através do sequenciamento do marcador filogenético do gene codificador do 16S rRNA e, determinando a capacidade destas bactérias de produzirem substâncias antimicrobianas através da realização de testes de produção de substâncias antimicrobianas (SAM).

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e preparação da Amostra

A esponja *Aplysina caissara* foi coletada nos meses de julho e outubro de 2018, no município de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, nos seguintes pontos: Guaecá (23° 49' 22.8" S - 45° 28' 19.2" O) e Ponta do Jarobá (23°49'30.36" - S 45°24'47.879" O), sendo dois e um indivíduo de *A. caissara* coletadas em cada local, respectivamente, totalizando em três indivíduos (Figura 1). A coleta foi realizada por meio de mergulho autônomo em profundidades entre 3 e 8 metros. As esponjas encontradas em cada local de coleta foram fotografadas *in vivo* com câmera digital subaquática para facilitar a sua identificação taxonômica, foram coletadas em sacos plásticos tipo Ziplock® e levadas ao Laboratório de Interações Hospedeiro-Microbiota (LIHM) onde foram processadas, de forma que uma estirpe de cada esponja foi utilizada para o isolamento bacteriano. A taxonomia morfológica das espécies de esponjas, usando os caracteres morfológicos e anatômicos, foi realizada pela Profa. Dra. Gisele Lôbo-Hajdu da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e pelo Prof. Dr. Márcio Custódio da Universidade de São Paulo. Além disso, as esponjas também foram identificadas molecularmente, procedimento conhecido como “*Sponge DNA barcoding*” (Wörheide et al., 2007). Para isso, o DNA foi extraído, sua qualidade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% e o mesmo foi quantificado no equipamento BioDrop (BioDrop, Reino Unido). Em seguida uma reação em cadeia da polimerase (“*polimerase chain reaction*” - PCR) com o gene mitocondrial citocromo-b (*citb*) (Lavrov et al., 2008) foi realizada. Os amplicons com tamanho do fragmento adequado e quantidade em ng/μL suficientes para o sequenciamento Sanger do gene *citb*, foram enviados para a empresa Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI, Botucatu). Os eletroferogramas resultantes foram checados manualmente com o software Sequence Scanner V.1 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e, em alguns casos, editados.

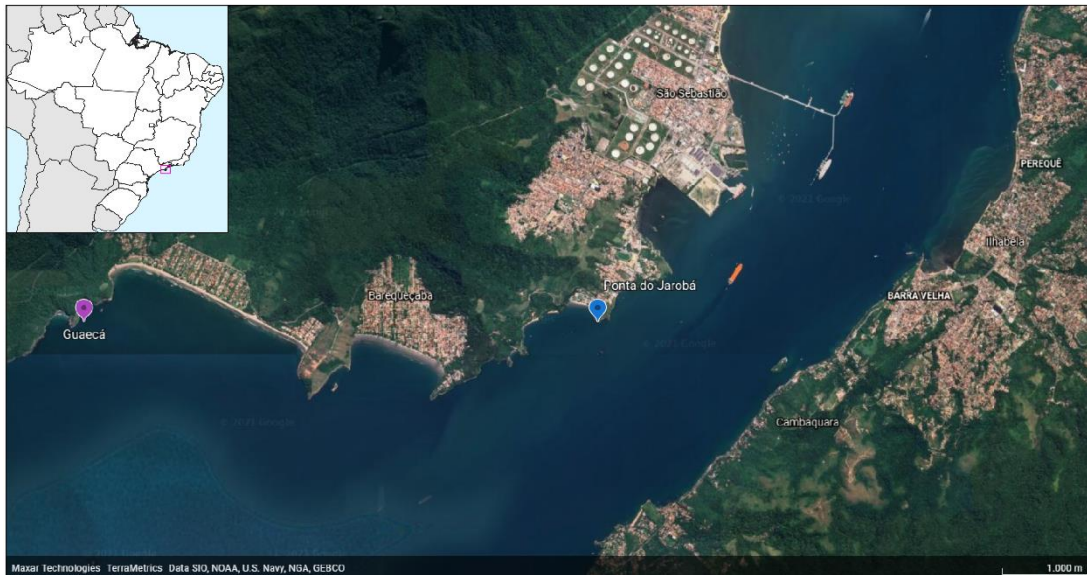


Figura 1. Mapa dos pontos de coleta Guaecá e Ponta do Jarobá

2.2. Isolamento e identificação de bactérias associadas à *A. caissara*.

Pedaços internos de 2,5 g de esponja foram cortados e macerados em 25 mL de água do mar artificial (“*artificial sea water*” - ASW). O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Falcon, e o resíduo restante da esponja foi descartado. Uma série de diluições foi preparada em

ASW, e 100 µl das diluições de 10^{-3} a 10^{-6} foram semeadas em placas de Petri com os seguintes meios: ricos (“*Brain Heart Infusion*” - BHI e R2A) e meios pobres (meio *marine* - M), assim como meio seletivo específico para comunidade de Actinobactéria (“*Actinomyces Isolation Agar*” - AIA). As placas de Petri foram incubadas por 7 dias a 25 °C e checadas diariamente, e após o crescimento das colônias, as mesmas foram caracterizadas de acordo com sua forma, elevação, margem, superfície, cor e textura. Após essa caracterização, as bactérias foram purificadas por esgotamento e uma vez confirmada a pureza das mesmas, estas foram colocadas em caldos BHI, R2A e Marinho para crescimento, e, após 18h, o DNA foi extraído seguindo o protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Estados Unidos).

A quantidade e qualidade do DNA extraído foi verificada. Para isso 1 µl de cada uma das amostras foram quantificadas no equipamento BioDrop (BioDrop, Reino Unido) e submetidas ao processo de eletroforese em gel de agarose 1%. Após a verificação de que a qualidade e a quantidade estavam adequadas, o DNA foi utilizado em uma PCR com o par de *primers*: 27F e 1492R (Weisburg et al., 1991) para o gene marcador filogenético do RNA ribossomal 16S (ou 16S rRNA). Os amplicons foram checados em gel de agarose 1% para verificar se os mesmos apresentavam o tamanho correto do gene, c. 1500 pares de bases. As bactérias que apresentaram fragmentos de tamanho adequado e quantidade em ng/µL suficientes para o sequenciamento Sanger do gene 16S rRNA, foram enviadas para a empresa BPI (Botucatu). Os eletroferogramas foram checados manualmente com o software Sequence Scanner V.1 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e, em alguns casos, editados.

As sequências do gene 16S rRNA geradas foram alinhadas usando o SINA “web aligner” e classificadas taxonomicamente usando os bancos de dados presentes no SILVA e um limite de confiança de 97%. As sequências filogeneticamente mais próximas dos isolados foram pesquisadas usando o algoritmo do blastn contra a base de referência do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Altschul et al., 1997; Pruesse et al., 2012).

2.3. Estrutura das bactérias associadas à *A. caissara*.

Para as inferências filogenéticas, as sequências foram agrupadas por filos, enquanto as sequências vizinhas de cada filo foram obtidas através do SINA. Foram incluídas como *outgroup*, sequências providas do trabalho de Simister et al. (2011) ajudando assim, na determinação das relações evolutivas entre organismos monofiléticos. As árvores filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA-X (Kumar et al., 2018; Tamura et al., 2021), por meio de duas abordagens distintas: *Maximum Likelihood* e *Neighbor-joining* ambas com um *bootstrap* de 1000 (Felsenstein, 1985).

2.4. Teste de produção de substância antimicrobiana (SAM)

O ensaio de produção de substâncias antimicrobianas (SAM) pelas bactérias isoladas de *A. caissara* foi realizado como descrito por Marinho et al. (2009). Os meios de cultivo utilizados para essa finalidade foram (i) BHI e (ii) R2A, ambos da fabricante BD (“*Becton, Dickson e Company*”). As bactérias indicadoras utilizadas para os testes em questão foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecium* (ATCC 19434). Ao serem adicionadas às placas em teste, o crescimento das bactérias indicadoras poderá ser inibido caso alguma das bactérias obtidas de *A. caissara* em questão tenha produzido substâncias antimicrobianas. Neste caso, será observada a formação de um halo inibitório ao redor da massa puntiforme, referente ao local onde a indicadora não foi capaz de se desenvolver.

1º) Cada estirpe obtida de *A. caissara* foi colocada para crescer em 3 mL de caldo, onde foi estocada (em meios BHI e R2A com água do mar) por 24 ou 48 horas até atingir sua fase log de crescimento à temperatura ambiente (25°C).

2º) Foi aplicado 10 µL do caldo com a estirpe obtida de *A. caissara*, sendo que cada placa de Petri poderia ter entre 4 e 5 estirpes. Cada placa foi estocada e deixada para crescer por cerca de 24 horas ou até ter atingido uma massa substancial. No mesmo dia, foram colocados 40 µL das bactérias indicadoras para crescer em 3 mL de caldo (BHI em água destilada) a 37°C.

3º) Após o crescimento nas placas das estirpes obtidas de *A. caissara*, as mesmas foram expostas a vapores de clorofórmio por cerca de 30 minutos através de algodão embebido em 0,5-1 mL de clorofórmio. Após esse tempo, o algodão foi retirado e as placas deixadas abertas no fluxo laminar para permitir a evaporação do produto. A estirpe indicadora foi colocada em meio semi-sólido, sendo: 3 mL de meio BHI para 30 µL do caldo de crescimento da bactéria indicadora, vertida sobre a placa e colocada em estufa à 37 °C. Após 24 horas, foi verificada a ocorrência, ou não, de halos inibidores ao redor da massa puntiforme, sendo consideradas apenas como estirpes marinhas SAM-positivas, isto é, produtoras de substâncias antimicrobianas, aquelas que apresentaram halos com diâmetros maiores ou iguais a 10 mm.

3. Resultados

3.1. Identificação bacteriana

A abordagem utilizada neste estudo resultou na caracterização de 63 bactérias isoladas de *Aplysina caissara* (Tabela 1). A classificação taxonômica realizada através do SILVA, demonstrou a presença de *Actinobacteria* (*Micrococcus* e *Brevibacterium*), *Bacteroidetes* (*Aquimarina*, *Aureiviga*, *Flavobacteriaceae* e *Tenacibaculum*), *Firmicutes* (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*) e *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* – *Acinetobacter*; e, *Gammaproteobacteria* - *Pseudovibrio* e *Vibrio*). O filo *Firmicutes* se mostrou o mais abundante ($n = 28$; 46,7%), sendo o gênero *Bacillus* o com maior número de representantes. Seguido por *Bacteroidetes* ($n = 11$; 18,3%), *Proteobacteria* ($n = 8$; 13,3%) e *Actinobacteria* ($n = 2$; 3,3%), somando-se 17 gêneros distintos e 11 estirpes não classificadas ($n = 11$; 18,3%), sugerindo a existência de novas espécies (Figura 2). Não foi possível a identificação das estirpes 288, 499 e 646 devido à baixa qualidade das sequências obtidas até o momento.

As sequências filogeneticamente mais próximas de todos os isolados resultaram em 32 espécies distintas, das quais *Priestia megaterium*, anteriormente conhecida como *Bacillus megaterium*, foi encontrada em maior quantidade. De forma geral, a similaridade obtida foi alta (> 97%). A maior parte das estirpes cujo o resultado obtido foi menor que 94% são as mesmas que retornaram como não classificadas pelo SINA. O menor valor de similaridade obtido foi de 78,38% para a estirpe 79E (não classificada) (Tabela 2). Considerando-se como possíveis novas espécies aquelas cuja similaridade obtida <98,6% e, como novos gêneros <95% (Cheng et al., 2015; Rossi-Tamisier et al., 2015), 31,7% do total de estirpes obtidas ($n = 20$) apresentam potencial para novas espécies e, 27% ($n = 17$) para novos gêneros. Essa similaridade pode ser vista também nas árvores filogenéticas obtidas para cada filo, tendo as sequências obtidas nesse estudo uma grande proximidade com outras bactérias de mesmo gênero ou famílias semelhantes (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). A estirpe 103, em particular, não obteve nenhuma similaridade significativa

Estirpe	Meio	Forma	Elevação	Margem	Superfície	Cor	Textura
1	Água destilada + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	amarela	viscosa
2	Água destilada + AGAR	Circular	Arredondada	Lisa	Lisa	Branco rosa/ marrom claro	pastosa
3	Água destilada + AGAR	Circular	Plana	Lisa	Lisa	amarelo forte	seca
19	Água destilada + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja	solida
20	Água destilada + AGAR	Irregular	Difusa	Curvada	Concêntrica	laranja	cremosa
26	ASW + AGAR	Circular	Plana	Lisa	Radial	avermelhado	seca
27	ASW + AGAR	Irregular	Difusa	Ondulada	Rugosa	transparente	seca
28	ASW + AGAR	Circular	Protuberância arredondada	Imprecisa Filamentos	Radial	branco com centro preto	seca
30	ASW + AGAR	Irregular	Difusa	a	Contornada	transparente	Dura/ seca
34	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja	solida
40	ASW + AGAR	Circular	Elevada	Ondulada	rugoso	Branco amarela mostarda	sólida
41	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	sem cor	cremosa
48	ASW + AGAR	Irregular	Difusa	Ondulada	Lisa	amarela	seca
50	ASW + AGAR	Irregular	Plana	Curvada	Contornada	amarela	açucarada
51	ASW + AGAR	Circular	Plana	Lisa	Lisa	Rosa claro	cremosa
52	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Branco amarelo claro	cremosa
53	ASW + AGAR	Circular	Plana	Ondulada	Concêntrica	amarelo	liquida
54	ASW + AGAR	Irregular	Elevada	Ondulada	rugosa	amarela	pastosa
55A	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja	cremosa
55B	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja	cremosa
56A	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja/ rosado	cremosa
56B	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	laranja/ rosado	cremosa
57	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Branco	cremosa
59	ASW + AGAR	Circular	Plana	Lisa	Lisa	Rosa claro	cremosa

Tabela 1. Continuação							
61	ASW + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Branco clara	cremosa
62	ASW + AGAR	Puntiforme	Arredondada	Ondulada	Lisa	branco forte	solida/sec a
79A	ASW + AGAR	Ovalada	Difusa	Lisa	Lisa	Laranja/ marrom	cremosa
79C	ASW + AGAR	Irregular	Plana	Ondulada	Lisa	transparente	cremosa
79D	ASW + AGAR	Irregular	Plana	Ondulada	Concêntrica	Branco claro	pastosa
79E	ASW + AGAR	Irregular	Convexa	Ondulada	Rugosa	Branco	dura
80	Água destilada + AGAR	elíptica	Plana	Lisa	Lisa	bege	cremosa
81	Água destilada + AGAR	elíptica	Plana	Lisa	Lisa	Rosa claro	cremosa
83	Água destilada + AGAR	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	rosa	cremosa
84	Água destilada + AGAR	Circular	Elevada	Ondulada	Contornada	Branco	pastosa
102	Água destilada + AGAR	ovalada	Convexa	Lisa	Lisa	Marrom claro	gelatinosa
103	BHI	Irregular	Efusa	Ondulada	Lisa	Mostarda	cremosa
104	BHI	Irregular	Plana	Ondulada	Contornada	Transparente	cremosa
105	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Branco clara	cremosa
106	BHI	Circular	Plana	Inteira	Contornada	Branco	pastosa
288	BHI	Irregular	Plana	Curvada	Lisa	Bege clara	cremosa
289	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Branco	cremosa
290	BHI	Irregular	Difusa	Ondulada	Granulosa	Fluorescente	Pastosa
291	BHI	Irregular	Difusa	Ondulada	Concêntrica	branco claro	cremosa
292	BHI	Irregular	Difusa	Ondulada	granulosa	fluorescente	pastosa
293	BHI	Irregular	Plana	Filamentos a	Rugosa	mostarda	pastosa
294	BHI	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Branco	gosmenta
295	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Branco	cremosa
296	BHI	Irregular	Plana	Imprecisa	Contornada	branco claro	cremosa
297	BHI	Circular	Plana	Curvada	Concêntrica	branco claro	cremosa
298	BHI	Irregular	Difusa	Ondulada	granulosa	fluorescente	pastosa
299	BHI	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Branco	cremosa
499	BHI	Irregular	Plana	Ondulada	Contornada	amarela	pastosa
500	BHI	Circular	Plana	Inteira	Concêntrica	amarela	cremosa
512	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	amarela	cremosa

Tabela 1. continuação							
590	BHI	Irregular	Enraizada	Ondulada	Contornada	rosa	pastosa
591	BHI	Circular	Enraizada	Ondulada	Lisa	mostarda	cremosa
592	BHI	rizoide	Plana	Ondulada	filamentosa	verde	seca
598	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	laranja	pastosa
645	BHI	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	bege	cremosa
646	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	amarela	cremosa
647	BHI	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Branco	pastosa

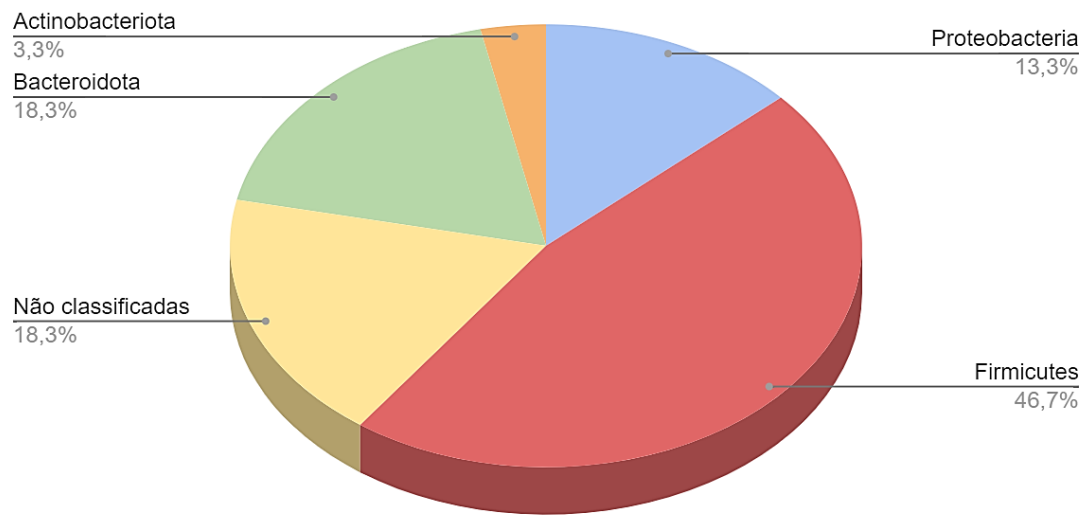


Figura 2. Afiliação taxonômica em nível de filo das bactérias isoladas de *A. caissara*.

307 **Tabela 2.** Afiliação taxonômica das bactérias isoladas de *A. caissara* classificada pelos bancos
308 de dados presentes no SILVA com a similaridade e código de acesso obtidos através do banco
309 de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Possíveis novas espécies
310 e gêneros estão indicados com * e #, respectivamente.

Estirpe bacteriana	Filo	Gênero	Espécie mais similar	Similaridade (%)	Código de acesso
1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	98.49% *	KJ806401
2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99.06%	KJ806401
3	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	99.34%	MG651512
19		Não classificada	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	93.77% *	EU430991
20	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	99.59%	MK484435
26	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Aquimarina</i>	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	98.28% *	MN822655
27		Não classificada	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	83.31% #	MN653288
28	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Halobacillus alkaliphilus</i>	84.96% #	MH384427
30A	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99.73%	CP054831
30B	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98.48% *	CP054831
30C	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	99.43%	MK934444
34	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	93.56% #	MF525762
40	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Aquimarina</i>	<i>Aquimarina spongiae</i>	99.60%	MK501323
41	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	94.68% #	MN704768
48B	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	99.36%	MG651538
48C	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100.00%	CP054831

Tabela 2. continuação

50	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	100.00%	MT585539
			<i>Flavobacteriaceae</i>		
51	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Aquimarina</i>	<i>bacterium</i>	99.72%	MN822655
			<i>Fictibacillus</i>		
52	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>phosphorivorans</i>	99.61%	MK484435
53	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	99.70%	KX268131
54	<i>Firmicutes</i>	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Oceanobacillus picturae</i>	94.46% #	MT433859
55A	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	99.69%	MT293409
			<i>Fictibacillus</i>		
55B	<i>Firmicutes</i>	<i>Fictibacillus</i>	<i>phosphorivorans</i>	100.00%	MK484435
					JN699219.
56A	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Aureivirga</i>	<i>Aureivirga marina</i>	98.10% *	2
56B	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	100.00%	MG651438
57	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	99.61%	MK099890
59	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	100.00%	HF584915
61	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	99.85%	MT293409
			<i>Staphylococcus</i>		
62A	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	97.26% *	MG205860
79A	<i>Firmicutes</i>	<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella thermotolerans</i>	99.86%	EU867316
79C	<i>Firmicutes</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus macroides</i>	93.78% #	MK568349
79D		Não classificada	<i>Azospirillum lipoferum</i>	85.24% #	LK391705
79E		Não classificada	<i>Domibacillus iocasae</i>	78.38% #	MK106263
			<i>Bacillus</i>		
80		Não classificada	<i>sporotheodurans</i>	91.70% #	EU430991

Tabela 2. continuação

		<i>Bacillus</i>			
81	Não classificada		<i>sporothermodurans</i>	92.11% #	EU430991
83	Não classificada		<i>Bacillus licheniformis</i>	90.14% #	LT797522
84	Não classificada		<i>Paenibacillus cookii</i>	87.67% #	MF179552
102	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	100.00%	MF193664
103	Não classificada	Nenhuma semelhança significativa encontrada			
104	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98.22% *	MG819696
105	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	96.60% *	MF594050
106	Não classificada		<i>Vibrio chagasii</i>	83.20% #	MT269611
289	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio owensii</i>	96.68% *	KC534407
					NR_04420
290	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98.09% *	2
291	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98.39% *	MG819696
			<i>Tenacibaculum</i>		NR_14584
292	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>holothuriorum</i>	95.56% *	5
293	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium iodinum</i>	97.70% *	KU894794
294	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.04%	MH201038
					MW04208
295	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	97.09% *	4
296	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98.64%	MG819696
297	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	97.93% *	MG819696
298	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98.24% *	MH044624
299	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	98.77%	MF594050

Tabela 2. continuação

512	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus humicus</i>	97.29% *	KM894193
590	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	99.02%	KY515414
			<i>Staphylococcus</i>		
591	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	98.93%	MT103055
592	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Priestia megaterium</i>	92.60% #	MG709180
598	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	96.97% *	MT507214
645	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	98.85%	KX990273
647	Não classificada		<i>Bacillus subtilis</i>	79.70% #	KU922482

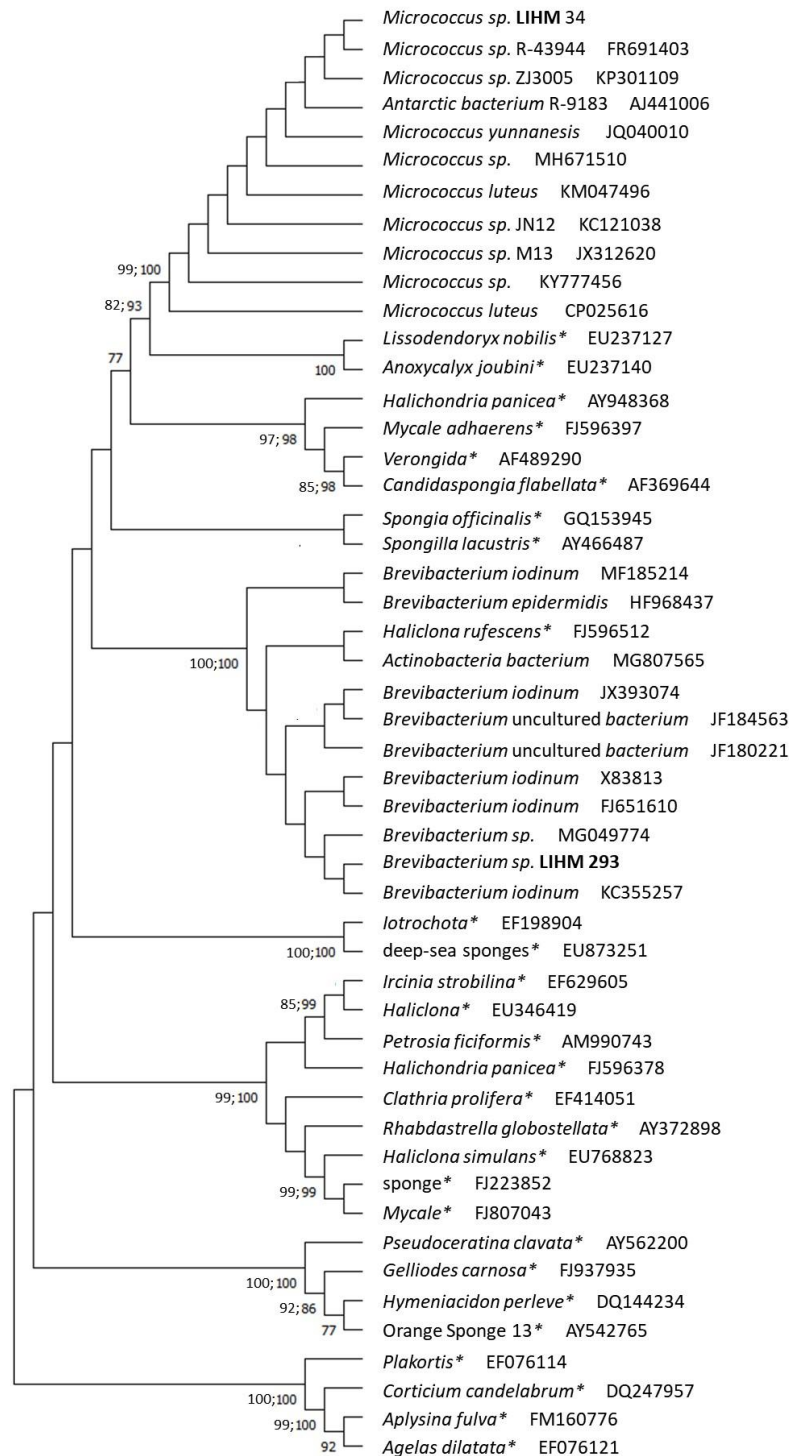


Figura 3. Inferência filogenética do filo *Actinobacteria* construída com base no gene 16S rRNA. A árvore apresenta o método Neighbor-Joining e, em seus nós é possível verificar os valores de bootstrap iguais ou superiores a 75% para os métodos de Maximum Likelihood à esquerda, e de Neighbor-Joining à direita. Valores abaixo de 75% foram indicados com um sinal de menos (-) quando um dos métodos apresentou um valor maior para o mesmo nó. Em negrito, estão identificadas as estirpes isoladas de *A. caissara* deste trabalho e, o asterisco indica espécies de esponjas das quais foram isoladas as bactérias.

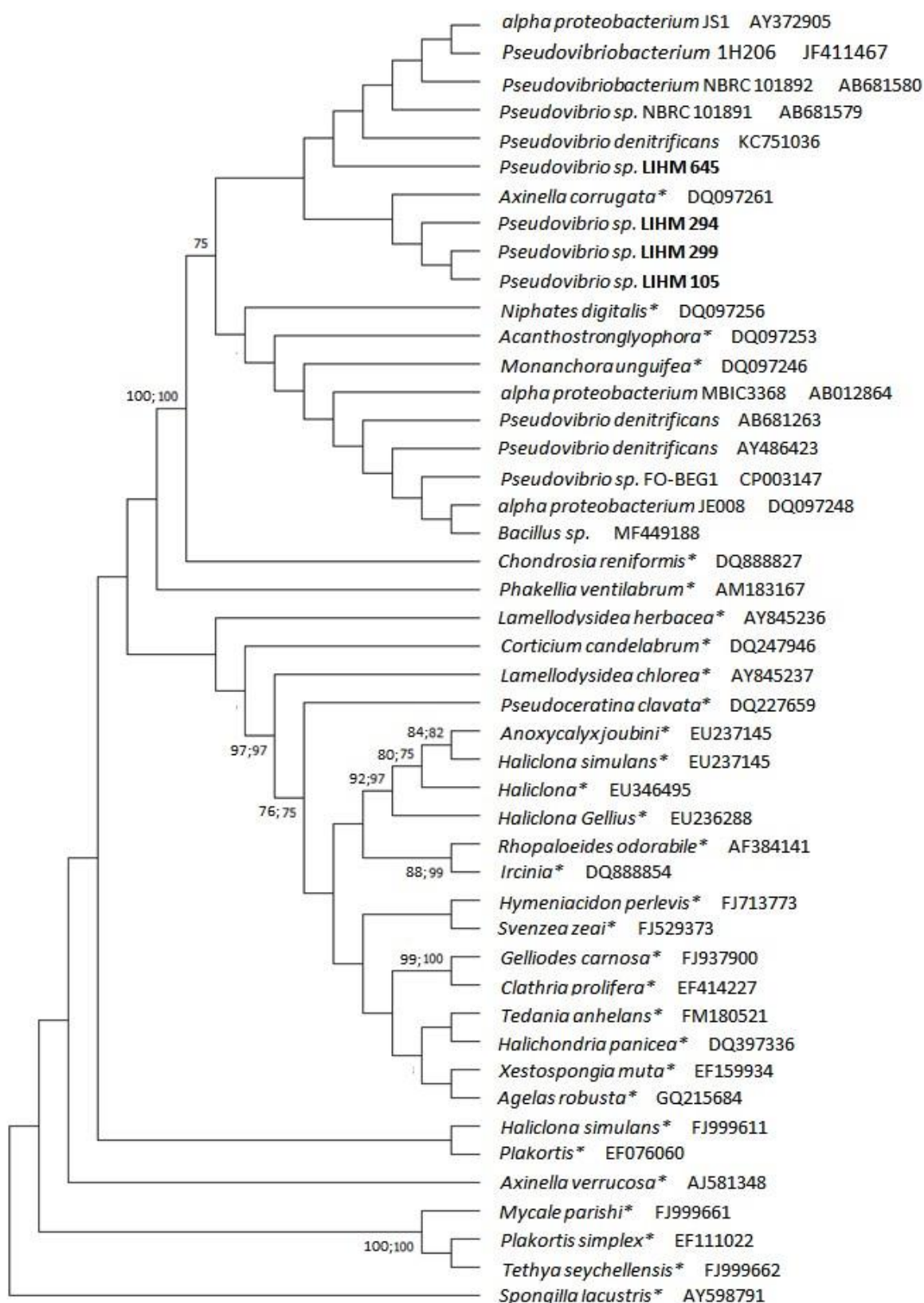


Figura 4. Inferência filogenética da classe Alphaproteobacteria (Proteobacteria) construída com base no gene 16S rRNA. Mais detalhes podem ser encontrados na Figura 2.

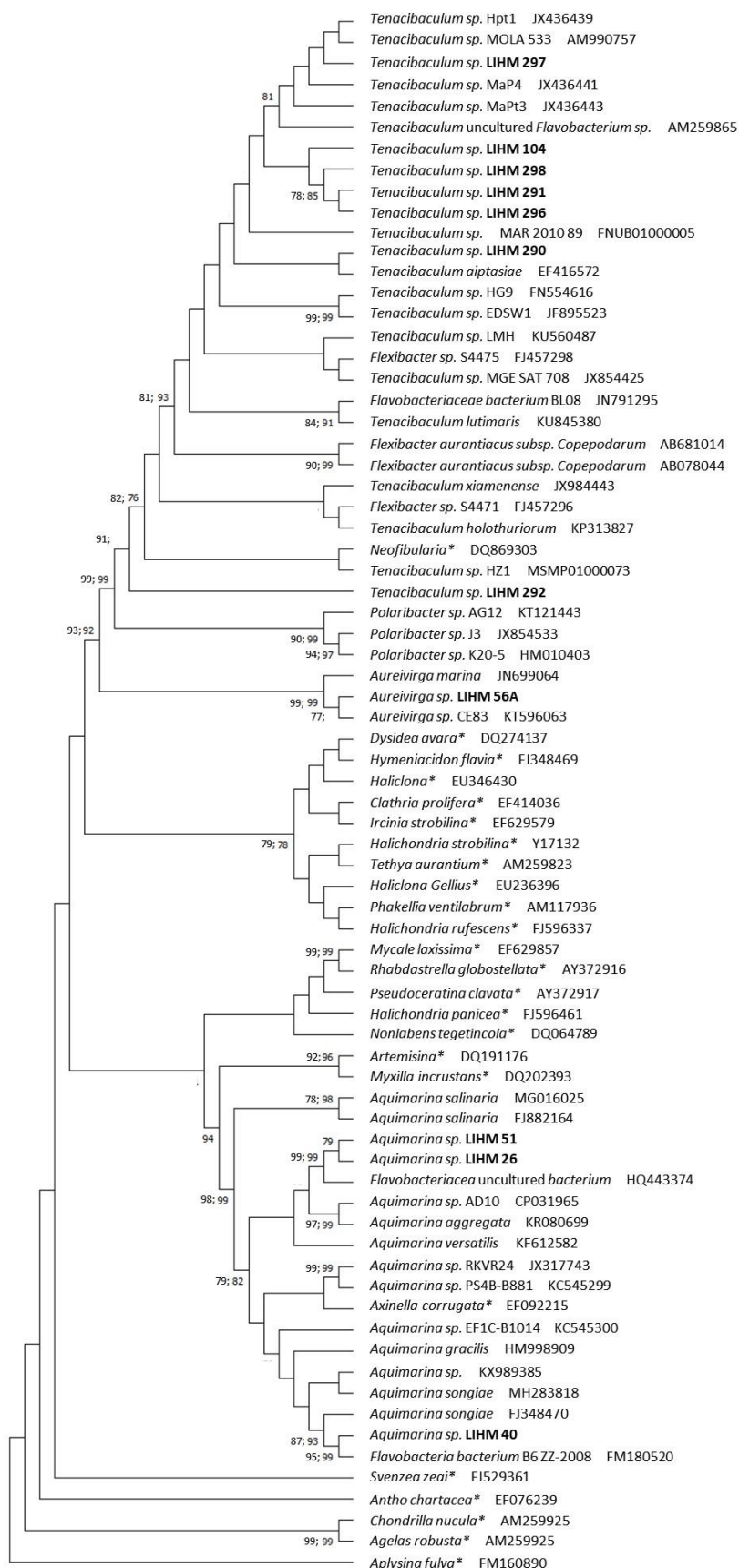


Figura 5. Inferência filogenética do filo *Bacteroidetes* construída com base no gene 16S rRNA. Mais detalhes podem ser encontrados na Figura 2.

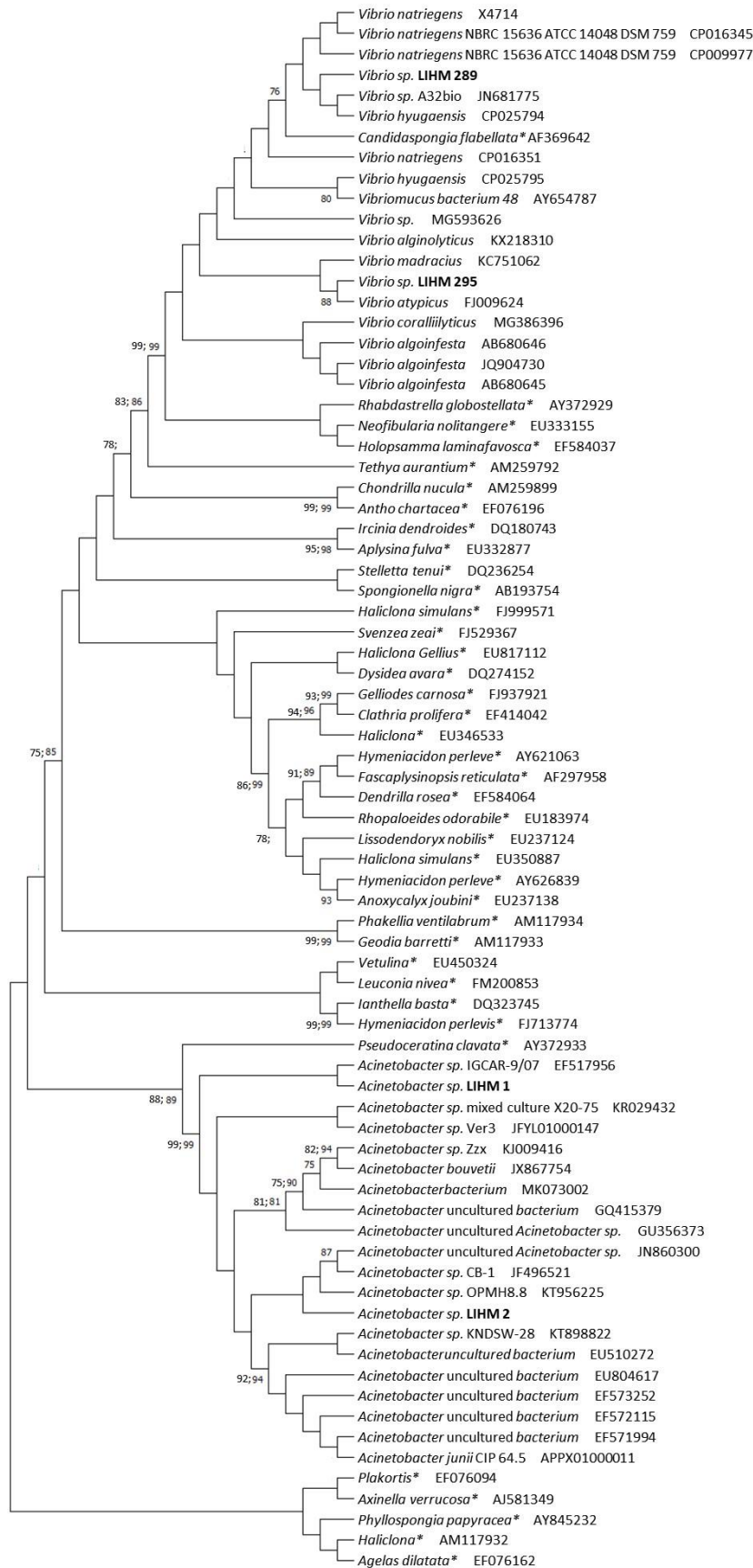


Figura 6. Inferência filogenética da classe Gammaproteobacteria (Proteobacteria) construída com base no gene 16S rRNA. Mais detalhes podem ser encontrados na Figura 2.

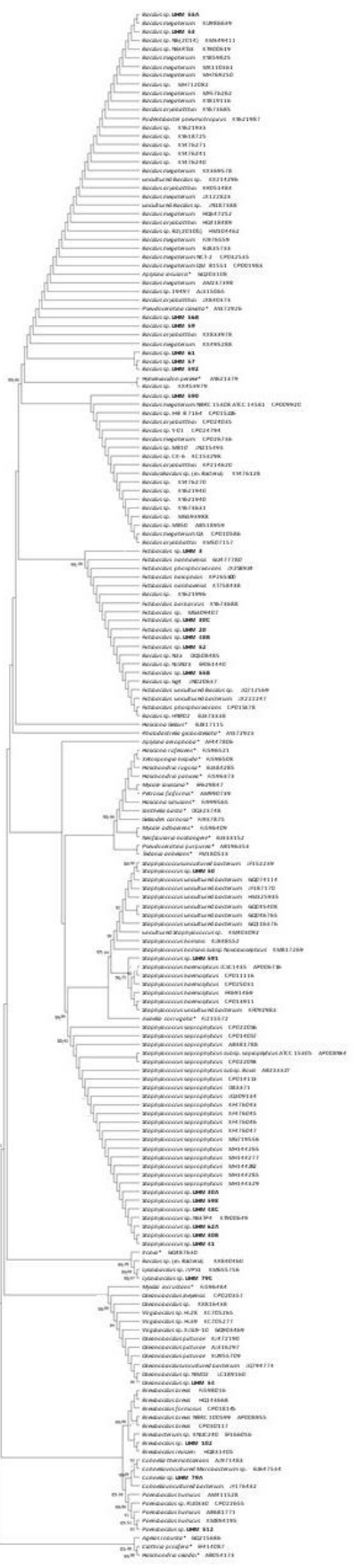


Figura 7. Inferência filogenética do filo *Firmicutes* construída com base no gene 16S rRNA. Mais detalhes podem ser encontrados na Figura 2.

3.2. Teste SAM

Todas as bactérias isoladas de *A. caissara* foram submetidas ao teste de produção de substâncias antimicrobianas (SAM) em placas com ágar em meios BHI e R2A. Esse teste permitiu a detecção de bactérias capazes de sintetizar compostos antimicrobianos que impediram o crescimento de estirpes indicadoras comuns e de interesse clínico, através da ocorrência, ou não, de halos de inibição. O clorofórmio foi utilizado a fim de garantir que as colônias isoladas não ficassem nas placas ao se colocar a indicadora para que, apenas a ação de uma possível substância sintetizada pela mesma, fosse analisada. De forma geral, dentre as indicadoras utilizadas no teste de produção antimicrobiana, a *S. aureus* foi a que se mostrou mais sensível, seguida pela *P. aeruginosa*. As indicadoras *E. coli* e *E. faecium* demonstraram uma maior resistência, tendo apresentado a formação de apenas cinco e dois halos de inibição, respectivamente.

Das 63 estirpes isoladas, 29 demonstraram a formação de halo inibidor para pelo menos uma das estirpes indicadoras em um dos meios testados, sendo considerados positivos aqueles com diâmetro maior ou igual a 10 mm (Tabela 3). A estirpe 499 foi a que apresentou a maior quantidade de halos inibitórios, contra *S. aureus* de 30 e 20 mm quando em BHI e R2A, respectivamente e, de 10 mm para *P. aeruginosa* e *E. coli*, ambas em R2A. Foi vista uma maior quantidade de resultados positivos contra *S. aureus* (Figuras 8 e 9), seguida pela *P. aeruginosa*, com média de 20 e 12 mm de diâmetro, respectivamente (Figuras 10 e 11). Apenas cinco estirpes foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, todas quando em meio R2A, sendo elas 28 (*Bacillus*), 105 (*Pseudovibrio*), 499, 598 (*Staphylococcus*), 646 com halos de 12, 15, 10, 20 e 15 mm respectivamente (Figura 12). Apenas as estirpes 288 e 590 exibiram formação de halo contra *E. faecium*, com diâmetros de 30 e 12 mm, respectivamente, ambas em meio R2A (Figura 13). Os resultados demonstraram preferência por parte das bactérias por um meio de cultivo em particular. As estirpes 103 e 512, por exemplo, apresentaram um melhor crescimento quando em meio BHI enquanto que a estirpe 105 cresceu mais em R2A (Figura 14). Em relação a estirpe 499, apesar de ter sido isolada em BHI e, crescido em ambos os meios, apenas apresentou halo de inibição contra *E. coli* quando em R2A (Figura 14). De forma geral, o meio R2A foi o que se mostrou mais positivo para a produção de antimicrobianos (Tabela 3).

362 **Tabela 3.** Atividade antimicrobiana exibida por bactérias isoladas de *A. caissara* contra bactérias
 363 indicadoras. A ausência de halos de inibição está indicada por um traço (-).

Estirpe	Gênero	Tamanho do halo (mm)							
		<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>E. faecium</i> (ATCC 19434)	
		BHI	R2A	BHI	R2A	BHI	R2A	BHI	R2A
1	<i>Acinetobacter</i>	-	10	10	-	-	-	-	-
3	<i>Fictibacillus</i>	10	22	12	-	-	-	-	-
20	<i>Fictibacillus</i>	-	20	-	-	-	-	-	-
28	Não Classificada	-	-	-	-	-	12	-	-
41	<i>Staphylococcus</i>	-	10	-	-	-	-	-	-
52	<i>Fictibacillus</i>	-	30	-	18	-	-	-	-
53	<i>Bacillus</i>	-	-	-	12	-	-	-	-
54	<i>Oceanobacillus</i>	-	15	-	15	-	-	-	-
55B	<i>Fictibacillus</i>	15	-	12	-	-	-	-	-
56A	<i>Aureivirga</i>	-	30	9	-	-	-	-	-
56B	<i>Bacillus</i>	-	15	-	-	-	-	-	-
57	<i>Bacillus</i>	12	-	-	-	-	-	-	-
59	<i>Bacillus</i>	10	-	-	-	-	-	-	-
61	<i>Bacillus</i>	10	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. continuação

62	<i>Staphylococcus</i>	-	15	-	-	-	-	-	-
79C	<i>Lysinibacillus</i>	-	-	-	10	-	-	-	-
84	Não Classificada	-	30	-	-	-	-	-	-
103	Não Classificada	25	30	-	-	-	-	-	-
104	<i>Tenacibaculum</i>	25	-	-	-	-	-	-	-
105	<i>Pseudovibrio</i>	-	30	-	-	-	15	-	-
106	Não Classificada	20	-	-	-	-	-	-	-
288	Sem sequência	-	-	-	-	-	-	-	30
293	<i>Brevibacterium</i>	-	25	-	-	-	-	-	-
499	Sem sequência	30	20	-	10	-	10	-	-
512	<i>Paenibacillus</i>	20	-	-	-	-	-	-	-
590	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	12
598	<i>Staphylococcus</i>	-	30	-	-	-	20	-	-
645	<i>Pseudovibrio</i>	-	20	-	-	-	-	-	-
646	Sem sequência	-	-	-	-	-	15	-	-
647	Não Classificada	-	25	-	-	-	-	-	-

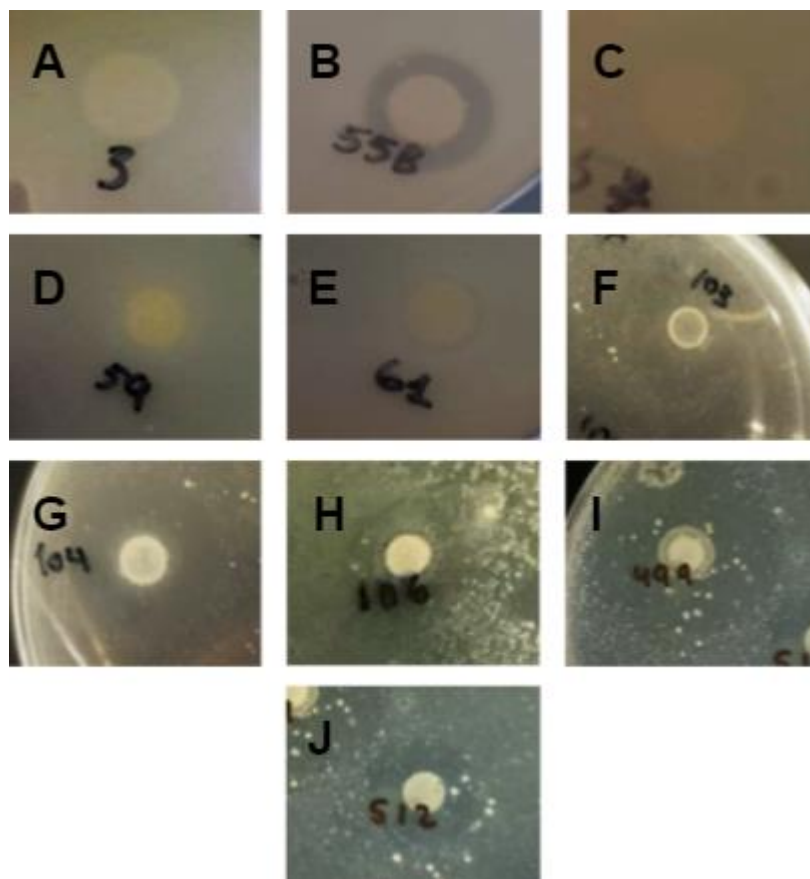


Figura 8. Formação de halos inibitórios em BHI contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).
A - estirpe 3; B - estirpe 55B; C - estirpe 57; D - estirpe 59; E - estirpe 61 F - estirpe 103; G -
estirpe 104; H - estirpe 106; I - estirpe 499; J - estirpe 512.

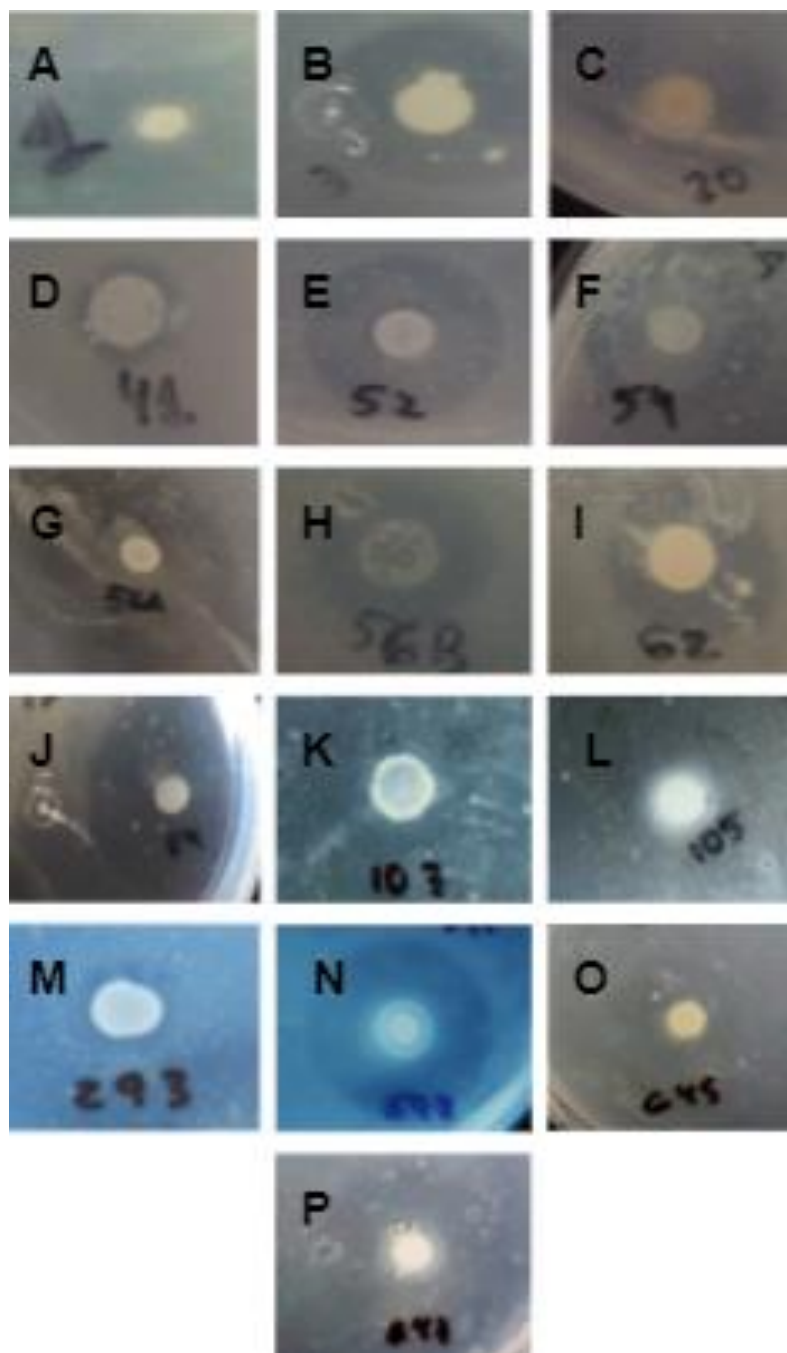


Figura 9. Formação de halos inibitórios em R2A contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).
A - estirpe 1; B - estirpe 3; C - estirpe 20; D - estirpe 41; E - estirpe 52; F - estirpe 54; G - estirpe
56A; H - estirpe 56B; I - estirpe 62; J - estirpe 84; K - estirpe 103; L - estirpe 105; M - estirpe
293; N - estirpe 598; O - estirpe 645; P - estirpe 647.

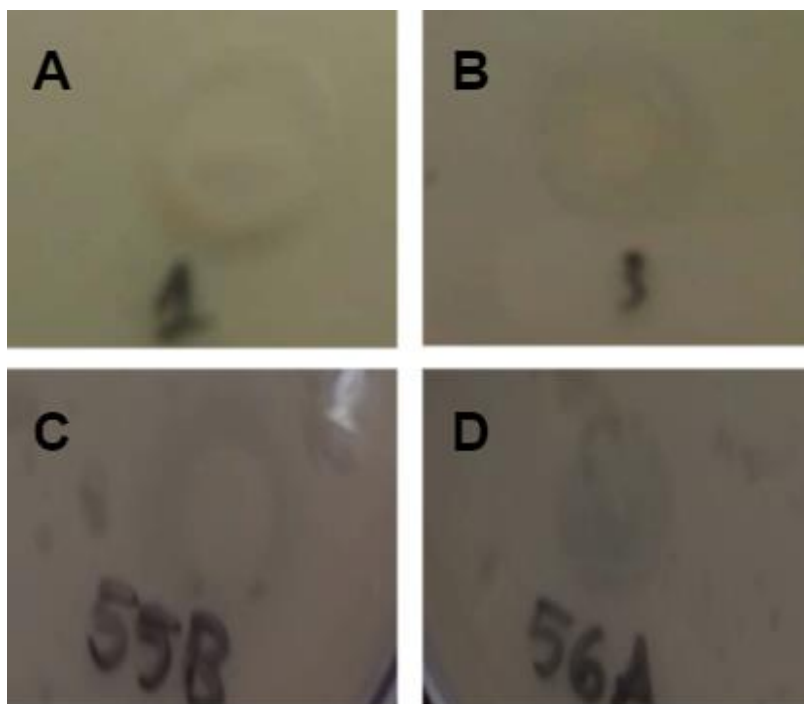


Figura 10. Formação de halos inibitórios em BHI contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A - estirpe 1; B - estirpe 3; C - estirpe 55B; D - estirpe 56A.

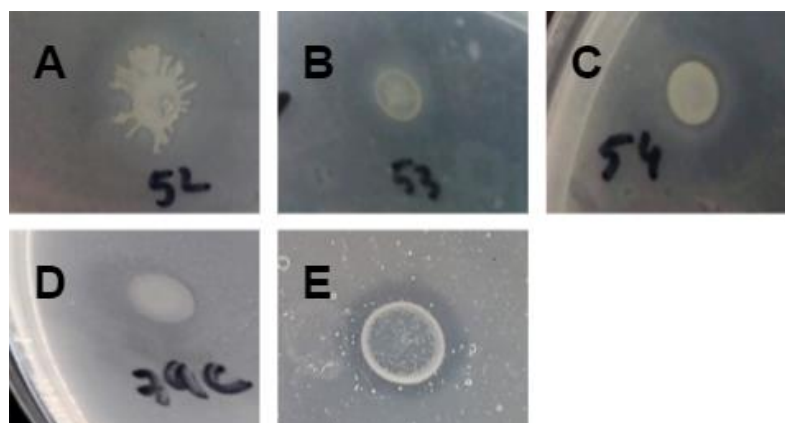


Figura 11. Formação de halos inibitórios em R2A contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A - estirpe 52; B - estirpe 53; C - estirpe 54; D - estirpe 79C; E - estirpe 499.

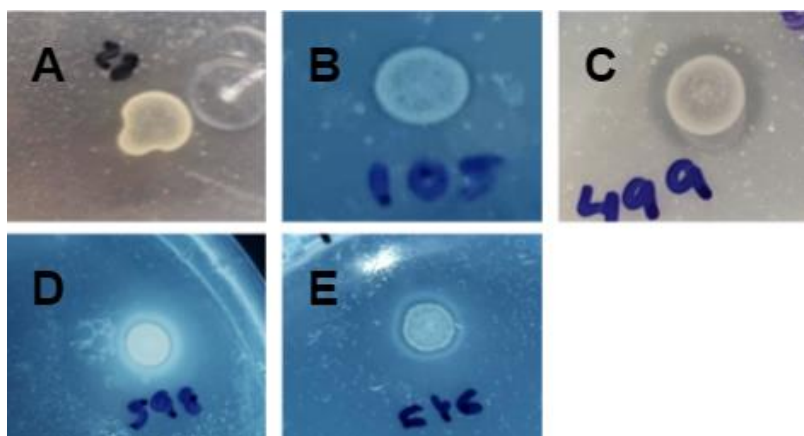


Figura 12. Formação de halos inibitórios em R2A contra *Escherichia coli* (ATCC 25922). A - estirpe 28; B - estirpe 105; C - estirpe 499; D - estirpe 598; E - estirpe 646.

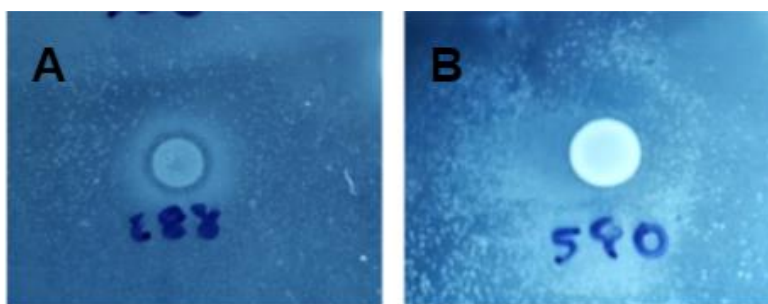


Figura 13. Formação de halos inibitórios em R2A contra *Enterococcus faecium* (ATCC 19434). A - estirpe 288; B - estirpe 590.

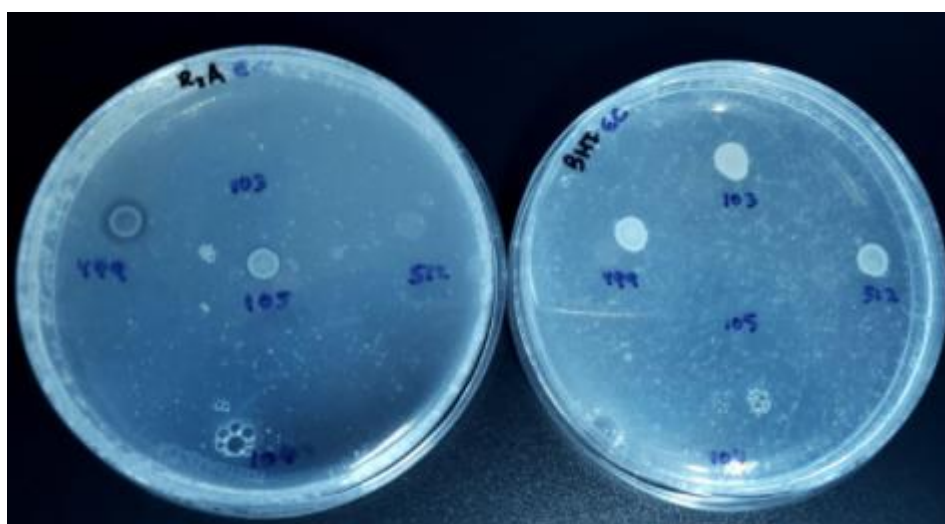


Figura 14. Comparação entre o crescimento das estirpes 103, 499, 105, 512 e 104 em meios R2A (à esquerda) e BHI (à direita) e das suas respectivas ações antimicrobianas contra a indicadora *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4. Discussão

Trabalhos com sequenciamento em profundidade demonstraram que a esponja *Aplysina caissara* possui uma complexa comunidade associada composta por bactérias, arqueias, fungos e eucariotos unicelulares (Hardoim et al., 2021a, 2021b), podendo assim apresentar um enorme potencial bioativo ainda desconhecido. Usando métodos independentes de cultivo, diversos estudos mostraram que espécies da família Aplysinidae também contêm uma grande diversidade de microrganismos associados (Shigemori et al., 1992; Kobayashi e Ishibashi, 1993; Unson et al., 1994; Hentschel, 2001; Tae e Fuerst, 2006; Hardoim et al., 2009; Zhang et al., 2009b, 2009a; Waters et al., 2014; Wilson et al., 2014; Gutleben et al., 2020). Estima-se que a diversidade bacteriana observada no presente estudo seja apenas uma fração da diversidade total de sua microbiota, visto que apenas uma pequena porcentagem (1%) das bactérias pode ser cultivada usando os meios de cultivo e técnicas de crescimento atualmente disponíveis (Amann et al., 1995). Quando comparado o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) bacterianas associadas à *A. caissara* coletada em Praia Preta e Guaecá (Hardoim et al., 2021a, 2021b) com as estirpes bacterianas cultivadas no presente trabalho, é possível dizer que o cultivo recuperou, respectivamente, entre, 0,08 e 0,1% da diversidade bacteriana presente nessa esponja.

O cultivo de bactérias associadas às esponjas é uma ferramenta importante para estudar a fisiologia e a função ecológica dos microrganismos (Stewart, 2012) e pode fornecer acesso a bactérias que escaparam da detecção com abordagens moleculares (Donachie et al., 2007; Shade et al., 2012). Além disso, fornece uma rota possível para a descoberta e identificação desses metabólitos bioativos. No entanto, essa prática apresenta algumas dificuldades, já que muitos microrganismos que são dominantes em certos ecossistemas permanecem resistentes ao cultivo (Joint et al., 2010). As bactérias são altamente seletivas, de forma que os meios e as condições de cultura permitam que, geralmente, apenas uma pequena fração das bactérias presentes em uma estirpe da esponja cresça e, consequentemente, seja isolada. Diversas abordagens de cultivo inovadoras vêm sendo empregadas, para possibilitar o isolamento de membros abundantes, raros ou até mesmo de grupos bacterianos específicos (Olson et al., 2000; Pimentel-Elardo et al., 2003; Sipkema et al., 2011; Jung et al., 2014; Lavy et al., 2014; Steinert et al., 2014). Entretanto, permanece um desafio cultivar microrganismos que são simbioses de esponjas (Hardoim e Costa, 2014; Montalvo et al., 2014; Esteves et al., 2016).

Segundo Joint e colaboradores (2010), essa dificuldade no cultivo das bactérias abundantes no meio marinho em geral, pode se dar por vários fatores como por exemplo: (i) a cultura de laboratório pode destruir as interações que ocorrem entre os organismos no ambiente natural; (ii) bactérias marinhas podem ser incapazes de crescer no substrato ou combinação de substratos fornecidos: como poucas bactérias marinhas estão em cultura, temos pouco conhecimento de substratos orgânicos ou concentrações que podem ser usadas no mar; (iii) infecções por vírus podem impedir o crescimento em cultura; (iv) as concentrações de substrato necessárias para o crescimento detectável no laboratório costumam ser muito altas, podendo ser tóxicas por si mesmas; (v) as práticas laboratoriais comuns tendem a negligenciar a primeira rodada de culturas em meio líquido que aparentemente não exibe crescimento visível, devido aos métodos de detecção de baixa densidade celular. Com isso, estima-se que a densidade populacional da microbiota associada às esponjas seja muito maior do que aquela que podemos identificar e cultivar em laboratório.

Para buscar um maior alcance das bactérias em associação com *A. caissara*, foram utilizados diferentes meios de cultivo à base de água do mar. O uso de diferentes meios e condições de cultivo permite um aumento significativo na riqueza da comunidade cultivada derivada de esponjas (Esteves et al., 2016, Sipkema et al., 2011). O crescimento das bactérias observado demonstrou a seletividade das mesmas por meios de cultivo distintos. Uma das possíveis explicações para essa ocorrência seria a similaridade entre as condições de crescimento que cada organismo necessita com aquelas oferecidas por um meio em particular. A estirpe 499, por exemplo, apesar de ter sido isolada e crescido em BHI, apresentou uma melhor produção antimicrobiana em R2A.

Mais de 60 filos de bactérias e arqueias já foram registrados como habitantes de esponjas marinhas (Moitinho-Silva et al., 2017). Sendo que, as linhagens bacterianas cultiváveis frequentemente isoladas de esponjas incluem membros dos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Cyanobacteria* (Esteves et al., 2016; Indraningrat et al., 2016, 2019). Dentre eles, os produtores bacterianos mais proeminentes de antimicrobianos são membros do filo *Actinobacteria*, seguidos por *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Cyanobacteria* (Thomas et al., 2010; Indraningrat et al., 2016; Brinkmann et al., 2017). Os resultados obtidos mostraram a presença de membros de todos os filos comumente relacionados com esponjas exceto pela ausência de membros do filo *Cyanobacteria* e, se mostraram similares aos obtidos por Kennedy et al. (2009), tendo os filos *Firmicutes* e *Proteobacterias* se mostrado propensos a exibir atividade antimicrobiana. Contudo, em relação ao filo *Actinobacteria*, não foi observada uma grande quantidade de representantes nem de atividade antimicrobiana como esperado.

Além do maior número de representantes, o filo *Firmicutes* foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana. Representantes de *Bacillus*, *Fictibacillus* e *Oceanobacillus* foram capazes de inibir o crescimento tanto de *S. aureus* quanto de *P. aeruginosa*. A estirpe 79C, única representante do gênero *Lysinibacillus*, isolado anteriormente em esponjas da família Irciniidae (Esteves et al., 2013), somente inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*. Segundo Indraningrat et al., (2016), 9% dos compostos bioativos atualmente conhecidos foram produzidos por *Bacillus* spp. associados à esponja, com atividades contra vírus, bactérias e fungos, apresentando um elevado potencial na busca de novas substâncias antimicrobianas. Foi observado que todas as representantes desse gênero, com exceção da estirpe 55A, foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das bactérias indicadoras testadas. O gênero *Fictibacillus*, relacionado filogeneticamente com *Bacillus*, também demonstrou atividades antimicrobianas. Mais da metade dos isolados deste gênero apresentaram alguma ação inibitória. Desses, a estirpe 20 foi a única a inibir apenas o crescimento de *S. aureus*, enquanto as outras inibiram o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A estirpe 52, foi a que obteve a maior formação de halo inibitório em meio R2A, contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apesar de ser considerado tipicamente terrestre, membros deste gênero têm sido isolados de ambiente marinho em inúmeras ocasiões, estando presente em sedimentos, esponjas e corais (Dastager et al., 2014; Wang et al., 2018; Indraningrat et al., 2019; Chen et al., 2020). Eles são conhecidos pela produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas ou citotóxicas, quando isolados de invertebrados marinhos (Muscholl-Silberhorn et al., 2008; Santos et al., 2010). *Staphylococcus* foi o segundo gênero mais abundante. Embora, estes isolados tenham sido muitas vezes relacionados com contaminantes do processo de isolamento, diversos estudos relataram a associação dos membros do gênero *Staphylococcus* com esponjas marinhas (Sfanos et al., 2005; Menezes et al., 2010; Indraningrat et al., 2016). Três dos representantes deste gênero foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, sendo que um deles também foi capaz de inibir *E. coli*.

Membros do filo *Bacteroidetes* estão presentes em grande número em ambientes marinhos (Glöckner et al., 1999; Brown, 2001; Khan et al., 2007) onde realizam diferentes funções de importância ecológica, tendo possíveis papéis no ciclo do carbono (Abell e Bowman, 2005), na degradação de matéria orgânica dissolvida e particulada (Cottrell e Kirchman, 2000; Davey et al., 2001), no desenvolvimento de patologias em peixes (Bernardet, 1998) e, na atividade contra microalgas (Maeda et al., 1998). Foram encontrados, neste trabalho, representantes dos gêneros *Tenacibaculum*, *Aureivirga* e *Aquimarina*. Até o momento, há poucos registros de *Aquimarina* sp. em esponjas marinhas e pouco se sabe sobre suas substâncias biologicamente ativas (Yoon et al., 2011; Zeng et al., 2013; Kennedy et al., 2014). Esse gênero foi anteriormente isolado de *Sarcotragus spinosulus*, tendo apresentado a presença de genes para a produção de compostos citotóxicos e, ação contra *S. aureus* (Esteves et al., 2013). Ao contrário do esperado, não foi registrada neste trabalho nenhuma atividade antimicrobiana de *Aquimarina*. Todos os gêneros do filo *Bacteroidetes* isolados de *A. caissara* pertencem à família *Flavobacteriaceae*, um dos principais ramos do referido filo que tem sido isolado de diferentes ambientes marinhos (Khan et al., 2007). A abundância de membros marinhos em *Flavobacteriaceae* sugere que essa família desempenhe um papel importante nos ecossistemas marinhos e nos ciclos biogeoquímicos, em interação com outros organismos

marinhos (Liu et al., 2006). Ao contrário do encontrado em outros estudos (Mohan et al., 2016), nenhuma das representantes deste filo apresentou atividade antimicrobiana.

O filo *Proteobacteria* é considerado o segundo filo bacteriano com maior quantidade de compostos bioativos conhecidos, após *Actinobacteria* (Bibi et al., 2017). Vários estudos de cultivo anteriores foram capazes de identificar uma grande variedade de *proteobacterias* derivadas de esponjas (Gunasekera et al., 2005), com mais de dois terços dos milhares de isolados cultivados de esponjas e outros invertebrados sendo pertencentes a *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Ao contrário do esperado, das bactérias isoladas nesse estudo apenas oito são representantes desse filo, tendo sido encontrados representantes de *Alphaproteobacteria* (*Pseudovibrio*) e *Gammaproteobacteria* (*Acinetobacter* e *Vibrio*). O gênero visto em maior quantidade foi o *Pseudovibrio*. Ele compreende um táxon de bactérias heterotróficas e anaeróbicas facultativas muito comumente encontrado em associação com organismos marinhos, incluindo esponjas, ascídias e tunicados (Hentschel, 2001; Webster e Hill, 2001; Shieh et al., 2004; Fukunaga et al., 2006; Sertan-de Guzman et al., 2007; Menezes et al., 2010). Segundo Indraningrat et al. (2016), *Pseudovibrio* é o segundo gênero bacteriano mais prolífico isolado de esponjas (20%) no que diz respeito às atividades antimicrobianas. Estudos anteriores mostraram atividade antibacteriana de *Pseudovibrio* spp. contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecium* (Santos et al., 2010; O' Halloran et al., 2011; Esteves et al., 2013). Contudo, foi observado que apenas duas representantes deste gênero apresentaram atividade antimicrobiana, ambas inibindo o crescimento de *S. aureus* e, apenas uma delas inibindo também o crescimento de *E. coli*. Bactérias do gênero *Vibrio* são normalmente encontradas em ambientes aquáticos onde são muitas vezes associadas às superfícies, mas também podem ser encontradas como bactérias pelágicas ou em várias profundidades no mar, sendo comumente encontradas em associação com esponjas marinhas (Santavy e Colwell, 1990; Sfanos et al., 2005; Mantovani, 2011). Representantes deste gênero são conhecidos por produzir uma ampla gama de compostos antibacterianos que favorecem ecologicamente seu hospedeiro (Chen et al., 2012; Phelan et al., 2012). Neste estudo, nenhum dos representantes deste gênero apresentaram atividades antimicrobianas, ao contrário do visto por Hardoim e Costa, (2014), onde o gênero *Vibrio* foi o que se mostrou mais ativo dentre os isolados de esponjas da família Irciniidae, sendo capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

O filo *Actinobacteria* foi o que apresentou menor número de representantes. As actinobactérias podem ser encontradas tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos e, são conhecidas por produzir compostos bioativos que podem ser desenvolvidos como antibióticos e outros compostos terapêuticos (Zhang et al., 2006; Dita et al., 2017). Embora esteja se tornando evidente que os habitats marinhos são uma fonte abundante de *Actinobacteria*, pouco se sabe sobre a diversidade deste grupo em estirpes marinhas quando comparados à diversidade de *Actinobacteria* isoladas de ambientes terrestres (Fenical e Jensen, 2006; Zhang et al., 2006; Hughes e Fenical, 2010). Essa baixa detecção desse grupo pode ter ocorrido devido aos limites impostos pelos meios de cultura, considerando os possíveis limitantes registrados por Zeng et al. (2013) como: temperatura, salinidade, pH, natureza das substâncias dissolvidas, periodicidade dos micróbios, ambientes especiais e relações simbióticas.

Essa diversidade de bactérias associadas à *Aplysina caissara*, demonstra a riqueza que essa espécie possui em seu microbioma, incluindo estirpes ainda não identificadas e, com baixos valores de similaridade com aquelas já conhecidas, possibilitando a descrição de novas espécies e gêneros. Grande parte destes isolados apresentou ação inibitória contra pelo menos uma estirpe de interesse clínico, o que reforça o potencial de produção de novos antimicrobianos. É importante que novos estudos sejam realizados com a microbiota associada à essa espécie, para que novos microrganismos e compostos bioativos possam ser descobertos.

Agradecimentos

Agradeço ao LHIM e a UNESP por possibilitarem a realização do projeto, à FAPESP pelo apoio financeiro, ao professor Wagner pelo suporte oferecido e, aos amigos de laboratório por toda ajuda e colaboração. Em especial, agradeço a minha orientadora Cris por me introduzir à pesquisa, por todos os ensinamentos, suporte e confiança. Agradeço à cada membro da família Buteko, por transformarem nossa república em um lar e, à toda turma DZ7, sem a qual o dia a dia na universidade teria sido muito mais difícil. Agradeço ao meu melhor amigo Raphael, por todo apoio emocional e ao Marcel por todo o auxílio. Por fim, agradeço à minha família por todo o amparo, principalmente aos meus pais que tornaram cada passo possível.

Referências

- Abell, G. C. J., and Bowman, J. P. (2005). Ecological and biogeographic relationships of class *Flavobacteria* in the Southern Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 265–277. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.001.
- Amann, R. L., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169. doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995.
- Bernardet, J.-F. (1998). *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* Infections in Cultured Marine Fish. *Fish Pathol.*, 11-99.
- Bibi, F., Faheem, M., I Azhar, E., Yasir, M., A Alvi, S., A Kamal, M., ... & I Naseer, M. (2017). Bacteria from marine sponges: A source of new drugs. *Current drug metabolism*, 18(1), 11-15..
- C. R. Wilkinson, R. G. and J. V. (1984). Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and in situ evidence. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 220, 519–528. doi:10.1098/rspb.1984.0018.
- Candice M. Brinkmann, A. M. and D. Í. K. (2017). An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexhausted Sources for Natural Product Discovery. *Diversity* 9, 40. doi:10.3390/d9040040.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R. (2019). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 36, 122–173. doi:10.1039/C8NP00092A.
- Chen, Y.-H., Kuo, J., Sung, P.-J., Chang, Y.-C., Lu, M.-C., Wong, T.-Y., et al. (2012). Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 3269–3279. doi:10.1007/s11274-012-1138-7.
- Chen, Y., Wang, W., Zhou, D., Jing, T., Li, K., Zhao, Y., et al. (2020). Biodegradation of lignocellulosic agricultural residues by a newly isolated *Fictibacillus* sp. YS-26 improving carbon metabolic properties and functional diversity of the rhizosphere microbial community. *Bioresour. Technol.* 310, 123381. doi:10.1016/j.biortech.2020.123381.
- Cheng, C., MacIntyre, L., Abdelmohsen, U. R., Horn, H., Polymenakou, P. N., Edrada-Ebel, R., et al. (2015). Biodiversity, Anti-Trypanosomal Activity Screening, and Metabolomic Profiling of *Actinomyces* Isolated from Mediterranean Sponges. *PLoS One* 10, e0138528. doi:10.1371/journal.pone.0138528.
- Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L. (2000). Natural Assemblages of Marine *Proteobacteria* and Members of the *Cytophaga-Flavobacter* Cluster Consuming Low- and High-Molecular-Weight Dissolved Organic Matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1692–1697. doi:10.1128/AEM.66.4.1692-1697.2000.
- Dastager, S. G., Mawlankar, R., Srinivasan, K., Tang, S.-K., Lee, J.-C., Ramana, V. V., et al. (2014). *Fictibacillus enclensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 461–469. doi:10.1007/s10482-013-0097-9.
- Davey, K. E., Kirby, R. R., Turley, C. M., Weightman, A. J., and Fry, J. C. (2001). Depth variation of

597 bacterial extracellular enzyme activity and population diversity in the northeastern North Atlantic
598 Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 48, 1003–1017. doi:10.1016/S0967-
599 0645(00)00106-5.

600 de Silva, E. D., and Scheuer, P. J. (1980). Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine
601 sponge (polejaeff). *Tetrahedron Lett.* 21, 1611–1614. doi:10.1016/S0040-4039(00)77766-5.

602 Dharmaraj, S., Ashokkumar, B., and Dhevendaran, K. (2010). Isolation of marine *Streptomyces* and the
603 evaluation of its bioactive potential. *African J. Microbiol. Res.* 4, 240–248.

604 Díez-Vives, C., Moitinho-Silva, L., Nielsen, S., Reynolds, D., and Thomas, T. (2017). Expression of
605 eukaryotic-like protein in the microbiome of sponges. *Mol. Ecol.* 26, 1432–1451.
606 doi:10.1111/mec.14003.

607 Dita, S. F., Budiarti, S. R. I., & LESTARI, Y. (2017). Sponge-associated *Actinobacteria*: Morphological
608 character and antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 3(1).

609 Donachie, S. P., Foster, J. S., and Brown, M. V (2007). Culture clash: challenging the dogma of
610 microbial diversity. *ISME J.* 1, 97–99. doi:10.1038/ismej.2007.22..

611 Esteves, A. I. S., Amer, N., Nguyen, M., and Thomas, T. (2016). Sample Processing Impacts the
612 Viability and Cultivability of the Sponge Microbiome. *Front. Microbiol.* 7.
613 doi:10.3389/fmicb.2016.00499.

614 Esteves, A. I. S., Hardoim, C. C. P., Xavier, J. R., Gonçalves, J. M. S., and Costa, R. (2013). Molecular
615 richness and biotechnological potential of bacteria cultured from Irciniidae sponges in the north-
616 east Atlantic. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 519–536. doi:10.1111/1574-6941.12140.

617 Esteves, A. I. S., Nicolai, M., Humanes, M., and Goncalves, J. (2011). Sulfated polysaccharides in
618 marine sponges: Extraction methods and anti-HIV activity. *Mar. Drugs* 9, 139–153.
619 doi:10.3390/md9010139.

620 F. Santos-Gandelman, Juliana; Giambiagi-deMarval, Marcia; M.R. Oelemann, Walter; S. Laport, M.
621 (2014). “Biotechnological Potential of Sponge-Associated Bacteria,” in *Current Pharmaceutical*
622 *Biotechnology*, 143-155(13).

623 Fenical, W., and Jensen, P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine
624 actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2, 666–673. doi:10.1038/nchembio841.

625 Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., and Harayama, S. (2006).
626 *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int. J. Syst. Evol.*
627 *Microbiol.* 56, 343–347. doi:10.1099/ij.s.0.63879-0.

628 Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P., & Borchellini, C.
629 (2012). No longer Demospongiae: Homoscleromorph sponges revisited by molecular phylogeny,
630 Linnaean classification and the PhyloCode. *Hydrobiologia*, 687(1), 3-10. Glöckner, F. O., Fuchs,
631 B. M., and Amann, R. (1999). Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First
632 Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721–
633 3726. doi:10.1128/AEM.65.8.3721-3726.1999.

634 Gunasekera, A. S., Sfanos, K. S., Harmody, D. K., Pomponi, S. A., McCarthy, P. J., and Lopez, J. V.
635 (2005). HBMMD: an enhanced database of the microorganisms associated with deeper water
636 marine invertebrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 373–376. doi:10.1007/s00253-004-1763-7.

637 Gutleben, J., Loureiro, C., Ramírez Romero, L. A., Shetty, S., Wijffels, R. H., Smidt, H., et al. (2020).
638 Cultivation of Bacteria From *Aplysina aerophoba*: Effects of Oxygen and Nutrient Gradients.
639 *Front. Microbiol.* 11, 1–19. doi:10.3389/fmicb.2020.00175.

640 Hardoim, C. C. P., Cardinale, M., Cúcio, A. C. B., Esteves, A. I. S., Berg, G., Xavier, J. R., et al.
641 (2014). Effects of sample handling and cultivation bias on the specificity of bacterial communities
642 in keratose marine sponges. *Front. Microbiol.* 5, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2014.00611.

643 Hardoim, C. C. P., Costa, R., Araújo, F. V., Hajdu, E., Peixoto, R., Lins, U., et al. (2009). Diversity of
644 Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Appl. Environ.*
645 *Microbiol.* 75, 3331–3343. doi:10.1128/AEM.02101-08.

646 Hardoim, C. C. P., Lôbo-Hajdu, G., Custódio, M. R., and Hardoim, P. R. (2021a). Prokaryotic, Fungal,
647 and Unicellular Eukaryotic Core Communities Across Three Sympatric Marine Sponges From the
648 Southwestern Atlantic Coast Are Dominated Largely by Deterministic Assemblage Processes.
649 *Front. Microbiol.* 12. doi:10.3389/fmicb.2021.674004.

650 Hardoim, C. C. P., Ramaglia, A. C. M., Lôbo-Hajdu, G., and Custódio, M. R. (2021b). Community
651 composition and functional prediction of prokaryotes associated with sympatric sponge species of
652 southwestern Atlantic coast. *Sci. Rep.* 11, 9576. doi:10.1038/s41598-021-88288-3.

653 Hardoim, C., and Costa, R. (2014). Microbial Communities and Bioactive Compounds in Marine
654 Sponges of the Family Irciniidae—A Review. *Mar. Drugs* 12, 5089–5122.
655 doi:10.3390/md12105089.

656 Hentschel, U. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from
657 the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*
658 35, 305–312. doi:10.1016/S0168-6496(01)00110-6.

659 Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., et al. (2003). “Microbial
660 Diversity of Marine Sponges,” in, 59–88. doi:10.1007/978-3-642-55519-0_3.

661 Hughes, C. C., and Fenical, W. (2010). Antibacterials from the Sea. *Chem. – A Eur. J.* 16, 12512–
662 12525. doi:10.1002/chem.201001279.

663 Indraningrat, A., Micheller, S., Runderkamp, M., Sauerland, I., Becking, L., Smidt, H., et al. (2019).
664 Cultivation of Sponge-Associated Bacteria from *Agelas sventres* and *Xestospongia muta*
665 Collected from Different Depths. *Mar. Drugs* 17, 578. doi:10.3390/md17100578.

666 Indraningrat, A., Smidt, H., and Sipkema, D. (2016). Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for
667 Antimicrobial Compounds. *Mar. Drugs* 14, 87. doi:10.3390/md14050087.

668 Joint, I., Mühling, M., and Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria - an essential prerequisite for
669 biodiscovery. *Microb. Biotechnol.* 3, 564–575. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x.

670 Jung, D., Seo, E.-Y., Epstein, S. S., Joung, Y., Han, J., Parfenova, V. V., et al. (2014). Application of a
671 new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake
672 Baikal, Russia. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n/a-n/a. doi:10.1111/1574-6941.12399.

673 Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., et al. (2009). Isolation and
674 Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans*
675 Collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* 11, 384–396. doi:10.1007/s10126-008-9154-1.

676 Kennedy, J., Margassery, L. M., O’Leary, N. D., O’Gara, F., Morrissey, J., and Dobson, A. D. W.
677 (2014). *Aquimarina amphilecti* sp. nov., isolated from the sponge *Amphilectus fucorum*. *Int. J.*
678 *Syst. Evol. Microbiol.* 64, 501–505. doi:10.1099/ijs.0.049650-0.

679 Khan, S. T., Nakagawa, Y., and Harayama, S. (2007). *Galbibacter mesophilus* gen. nov., sp. nov., a
680 novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 969–973.
681 doi:10.1099/ijs.0.64729-0.

682 Kobayashi, J., and Ishibashi, M. (1993). Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms.
683 *Chem. Rev.* 93, 1753–1769. doi:10.1021/cr00021a005.

684 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary
685 genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
686 doi:10.1093/molbev/msy096.

687 Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new
688 antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 86-105. Lavrov, D. V., Wang,
689 X., and Kelly, M. (2008). Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using
690 mitochondrial genomic data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 111–124.
691 doi:10.1016/j.ympev.2008.05.014.

692 Lavy, A., Keren, R., Haber, M., Schwartz, I., and Ilan, M. (2014). Implementing sponge physiological
693 and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. *FEMS*
694 *Microbiol. Ecol.* 87, 486–502. doi:10.1111/1574-6941.12240.

- 695 Li, Z. (2009). Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical
696 Metabolites. *Mar. Drugs* 7, 113–129. doi:10.3390/md7020113.
- 697 Lira, T. O. de, Berlinck, R. G. S., Nascimento, G. G. F., and Hajdu, E. (2006). Further dibromotyrosine-
698 derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 1233–
699 1240. doi:10.1590/S0103-50532006000700007.
- 700 Liu, Z.-P., Wang, B.-J., Dai, X., Liu, X.-Y., and Liu, S.-J. (2006). *Zhouia amylolytica* gen. nov., sp.
701 nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from sediment of the South China
702 Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2825–2829. doi:10.1099/ijs.0.64587-0.
- 703 Love, G. D., Grosjean, E., Stalvies, C., Fike, D. A., Grotzinger, J. P., Bradley, A. S., et al. (2009). Fossil
704 steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* 457, 718–
705 721. doi:10.1038/nature07673.
- 706 Maeda, T., Murakami, M., Ohsugi, S. Y., Furushita, M., Mitsutani, A., and Shiba, T. (1998).
707 Perspectives of the Development of 16S rDNA Probe Specific for Algicidal and/or Algal-lytic
708 Gliding Bacteria. *Fish. Sci.* 64, 861–865. doi:10.2331/fishsci.64.861.
- 709 Mantovani, C. K. (2011). Diversidade e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas de esponjas
710 marinhas.
- 711 Marinho, P. R., Moreira, A. P. B., Pellegrino, F. L. P. C., Muricy, G., Bastos, M. do C. de F., Santos, K.
712 R. N. dos, et al. (2009). Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial
713 substances against antibiotic-resistant bacteria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 678–682.
714 doi:10.1590/S0074-02762009000500002.
- 715 Mark V. Brown, J. P. B. (2001). A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities
716 (SIMCO). *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 267–275. doi:10.1016/S0168-6496(01)00100-3.
- 717 Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H. D., Justo,
718 M. R., et al. (2010). Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the
719 north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res.* 165, 466–482.
720 doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- 721 Mohan, G., Thipparamalai Thangappanpillai, A. K., and Ramasamy, B. (2016). Antimicrobial activities
722 of secondary metabolites and phylogenetic study of sponge endosymbiotic bacteria, *Bacillus* sp. at
723 Agatti Island, Lakshadweep Archipelago. *Biotechnol. Reports* 11, 44–52.
724 doi:10.1016/j.btre.2016.06.001.
- 725 Moitinho-Silva, L., Nielsen, S., Amir, A., Gonzalez, A., Ackermann, G. L., Cerrano, C., et al. (2017).
726 The sponge microbiome project. *Gigascience* 6. doi:10.1093/gigascience/gix077.
- 727 Montalvo, N. F., Davis, J., Vicente, J., Pittiglio, R., Ravel, J., and Hill, R. T. (2014). Integration of
728 Culture-Based and Molecular Analysis of a Complex Sponge-Associated Bacterial Community.
729 *PLoS One* 9, e90517. doi:10.1371/journal.pone.0090517.
- 730 Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V., and Imhoff, J. F. (2008). Abundance and Bioactivity of Cultured
731 Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* 55, 94–106.
732 doi:10.1007/s00248-007-9255-9.
- 733 Nguyen, M. T. H. D., Liu, M., and Thomas, T. (2014). Ankyrin-repeat proteins from sponge symbionts
734 modulate amoebal phagocytosis. *Mol. Ecol.* 23, 1635–1645. doi:10.1111/mec.12384.
- 735 O' Halloran, J. A., Barbosa, T. M., Morrissey, J. P., Kennedy, J., O' Gara, F., and Dobson, A. D. W.
736 (2011). Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. *J.*
737 *Appl. Microbiol.* 110, 1495–1508. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05008.x.
- 738 Olson, J. B., Lord, C. C., and McCarthy, P. J. (2000). Improved recoverability of microbial colonies
739 from marine sponge samples. *Microb. Ecol.* 40, 139–147. doi:10.1007/s002480000058.
- 740 Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A.,
741 Dias, S. C., et al. (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for
742 microbial infection control. *FASEB J.* 24, 1320–1334. doi:10.1096/fj.09-143388.
- 743 Pabel, C. T., Vater, J., Wilde, C., Franke, P., Hofemeister, J., Adler, B., et al. (2003). Antimicrobial

744 Activities and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of *Bacillus*
745 Isolates from the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Biotechnol.* 5, 424–434.
746 doi:10.1007/s10126-002-0088-8.

747 Phelan, R. W., O'Halloran, J. A., Kennedy, J., Morrissey, J. P., Dobson, A. D. W., O'Gara, F., et al.
748 (2012). Diversity and bioactive potential of endospore-forming bacteria cultured from the marine
749 sponge *Haliclona simulans*. *J. Appl. Microbiol.* 112, 65–78. doi:10.1111/j.1365-
750 2672.2011.05173.x.

751 Pimentel-Elardo, S., Wehrli, M., Friedrich, A., Jensen, P., and Hentschel, U. (2003). Isolation of
752 *planctomycetes* from *Aplysina* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 239–245.
753 doi:10.3354/ame033239.

754 Pinheiro, U. dos S., and Hajdu, E. (2001). Shallow-water *Aplysina Nardo* (Aplysinidae, Verongida,
755 Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern
756 Atlantic), with the description of a new species and a literature review of other Brazilian records
757 of the genus. *Rev. Bras. Zool.* 18, 143–160. doi:10.1590/s0101-81752001000500012.

758 Pruesse, E., Peplies, J., and Glöckner, F. O. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence
759 alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28, 1823–1829.
760 doi:10.1093/bioinformatics/bts252.

761 Rochelle W. Newbold, Paul R. Jensen, William Fenical, J. R. P. (1999). Antimicrobial activity of
762 Caribbean marine sponge extracts. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 279–284.

763 Rossi-Tamisier, M., Benamar, S., Raoult, D., and Fournier, P.-E. (2015). Cautionary tale of using 16S
764 rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *Int.*
765 *J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1929–1934. doi:10.1099/ijs.0.000161.

766 Saeki, B. M., Granato, A. C., Berlinck, R. G. S., Magalhães, A., Schefer, A. B., Ferreira, A. G., et al.
767 (2002). Two unprecedented dibromotyrosine-derived alkaloids from the Brazilian endemic marine
768 sponge *Aplysina caissara*. *J. Nat. Prod.* 65, 796–799. doi:10.1021/np0105735.

769 Santavy, D., and Colwell, R. (1990). Comparison of bacterial communities associated with the
770 Caribbean sclero-sponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*
771 67, 73–82. doi:10.3354/meps067073.

772 Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M. L., Santos, J. F. M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., and
773 Laport, M. S. (2010). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with
774 antimicrobial activities from Brazil. *Res. Microbiol.* 161, 604–612.
775 doi:10.1016/j.resmic.2010.05.013.

776 Santos, O. C. S., Soares, A. R., Machado, F. L. S., Romanos, M. T. V., Muricy, G., Giambiagi-
777 deMarval, M., et al. (2015). Investigation of biotechnological potential of sponge-associated
778 bacteria collected in Brazilian coast. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 140–147. doi:10.1111/lam.12347.

779 Schmitt, S., Angermeier, H., Schiller, R., Lindquist, N., and Hentschel, U. (2008). Molecular Microbial
780 Diversity Survey of Sponge Reproductive Stages and Mechanistic Insights into Vertical
781 Transmission of Microbial Symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7694–7708.
782 doi:10.1128/AEM.00878-08.

783 Sertan-de Guzman, A. A., Predicala, R. Z., Bernardo, E. B., Neilan, B. A., Elardo, S. P., Mangalindan,
784 G. C., et al. (2007). *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing
785 bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 188–196.
786 doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00950.x.

787 Sfanos, K., Harmody, D., Dang, P., Ledger, A., Pomponi, S., McCarthy, P., et al. (2005). A molecular
788 systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Syst. Appl.*
789 *Microbiol.* 28, 242–264. doi:10.1016/j.syapm.2004.12.002.

790 Shade, A., Hogan, C. S., Klimowicz, A. K., Linske, M., McManus, P. S., and Handelsman, J. (2012).
791 Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environ. Microbiol.* 14, 2247–2252.
792 doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02817.x.

793 Shieh, W. Y., Lin, Y.-T., and Jean, W. D. (2004). *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a

794 marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int. J. Syst.*
795 *Evol. Microbiol.* 54, 2307–2312. doi:10.1099/ijls.0.63107-0.

796 Shigemori, H., Bae, M. A., Yazawa, K., Sasaki, T., and Kobayashi, J. (1992). Alteramide A, a new
797 tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge
798 *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.* 57, 4317–4320. doi:10.1021/jo00041a053.

799 Simister, R. L., Deines, P., Botté, E. S., Webster, N. S., and Taylor, M. W. (2012). Sponge-specific
800 clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ.*
801 *Microbiol.* 14, 517–524. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02664.x.

802 Simister, R. L., Schmitt, S., and Taylor, M. W. (2011). Evaluating methods for the preservation and
803 extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges. *J. Exp.*
804 *Mar. Bio. Ecol.* 397, 38–43. doi:10.1016/j.jembe.2010.11.004.

805 Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., and Gerwick, W. H. (2005). Marine natural
806 products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* 4, 333–342.

807 Sipkema, D., de Caralt, S., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Smidt, H., et al. (2015).
808 Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission.
809 *Environ. Microbiol.* 17, 3807–3821. doi:10.1111/1462-2920.12827.

810 Sipkema, D., Schippers, K., Maalcke, W. J., Yang, Y., Salim, S., and Blanch, H. W. (2011). Multiple
811 Approaches To Enhance the Cultivability of Bacteria Associated with the Marine Sponge
812 *Haliclona (gellius) sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2130–2140. doi:10.1128/AEM.01203-10.

813 Steinert, G., Whitfield, S., Taylor, M. W., Thoms, C., and Schupp, P. J. (2014). Application of
814 Diffusion Growth Chambers for the Cultivation of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Mar.*
815 *Biotechnol.* 16, 594–603. doi:10.1007/s10126-014-9575-y.

816 Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, W. M.
817 and D. J. L. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database
818 search programs. *Oxford Univ. Press* 24, 3389–3402. doi:10.2503/jjshs.58.977.

819 Stewart, E. J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *J. Bacteriol.* 194, 4151–4160.
820 doi:10.1128/JB.00345-12.

821 Tae, K. K., and Fuerst, J. A. (2006). Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated
822 with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: Culture-dependent and culture-independent
823 approaches. *Environ. Microbiol.* 8, 1460–1470. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01040.x.

824 Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
825 Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120.

826 Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., and Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms:
827 Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 295–347.
828 doi:10.1128/MMBR.00040-06.

829 Taylor, M. W., Tsai, P., Simister, R. L., Deines, P., Botte, E., Ericson, G., et al. (2013). ‘Sponge-
830 specific’ bacteria are widespread (but rare) in diverse marine environments. *ISME J.* 7, 438–443.
831 doi:10.1038/ismej.2012.111.

832 Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., and LokaBharathi, P. A. (2010). Marine Drugs from Sponge-
833 Microbe Association—A Review. *Mar. Drugs* 8, 1417–1468. doi:10.3390/md8041417.

834 Trindade-Silva, A. E., Rua, C., Silva, G. G. Z., Dutilh, B. E., Moreira, A. P. B., Edwards, R. A., et al.
835 (2012). Taxonomic and Functional Microbial Signatures of the Endemic Marine Sponge
836 *Arenosclera brasiliensis*. *PLoS One* 7, e39905. doi:10.1371/journal.pone.0039905.

837 ULISSES DOS S. PINHEIRO, E. H. & M. R. C. (2007). *Aplysina Nardo* (Porifera, Verongida,
838 *Aplysinidae*) from the Brazilian coast with description of eight new species. *Zootaxa*.

839 Unson, M. D., Holland, N. D., and Faulkner, D. J. (1994). A brominated secondary metabolite
840 synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the
841 crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119, 1–11. doi:10.1007/BF00350100.

- 842 Vacelet, J., and Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some
843 sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 30, 301–314. doi:10.1016/0022-0981(77)90038-7.
- 844 Van Soest, Rob WM, Ratih Aryasari, and Nicole J. De Voogd. "Mycale species of the tropical Indo-
845 West Pacific (Porifera, Demospongiae, Poecilosclerida)." *Zootaxa* 4912.1 (2021): 1-212.
- 846 Wang, G. (2006). Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia.
847 *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 545–551. doi:10.1007/s10295-006-0123-2.
- 848 Wang, H.-L., Zhang, J., and Sun, L. (2018). *Fictibacillus iocasae* sp. nov., isolated from the deep-sea
849 sediment in Pacmanus, Manus Basin. *Arch. Microbiol.* 200, 1123–1128. doi:10.1007/s00203-018-
850 1527-x.
- 851 Waters, A. L., Peraud, O., Kasanah, N., Sims, J. W., Kothalawala, N., Anderson, M. A., et al. (2014).
852 An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an *actinomycete* that
853 produces the natural product manzamine A. *Front. Mar. Sci.* 1, 1–15.
854 doi:10.3389/fmars.2014.00054.
- 855 Webster, N. S., and Hill, R. T. (2001). The culturable microbial community of the Great Barrier Reef
856 sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -*Proteobacterium*. *Mar. Biol.* 138, 843–851.
857 doi:10.1007/s002270000503.
- 858 Wehrh, M., Steinert, M., and Hentschel, U. (2007). Bacterial Uptake by the Marine Sponge *Aplysina*
859 *aerophoba*. *Microb. Ecol.* 53, 355–365. doi:10.1007/s00248-006-9090-4.
- 860 WILKINSON, C. (1987). Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology.
861 *Symbiosis (Philadelphia, PA)* 4, 135–145.
- 862 Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., et al. (2014). An
863 environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 506, 58–62.
864 doi:10.1038/nature12959.
- 865 Wörheide, G., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., Larroux, C., Maldonado, M., Voigt, O., et al. (2012).
866 Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera). doi:10.1016/B978-0-12-387787-
867 1.00007-6.
- 868 Wörheide, G., Erpenbeck, D., and Menke, C. (2007). The Sponge Barcoding Project: aiding in the
869 identification and description of poriferan taxa. *Porifera Res. Biodiversity, Innov. Sustain.*, 123–
870 128. Available at: [http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/iss/09-book/pdf/Worheide et al - The](http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/iss/09-book/pdf/Worheide%20et%20al%20-%20The%20Sponge%20Barcoding%20Project.pdf)
871 [Sponge Barcoding Project.pdf](http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/iss/09-book/pdf/Worheide%20et%20al%20-%20The%20Sponge%20Barcoding%20Project.pdf).
- 872 Yoon, B.-J., You, H.-S., Lee, D.-H., and Oh, D.-C. (2011). *Aquimarina spongiae* sp. nov., isolated from
873 marine sponge *Halichondria oshoro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 417–421.
874 doi:10.1099/ijs.0.022046-0.
- 875 Zeng, Z., Zhao, J., Ke, C., and Wang, D. (2013). Antimicrobial activities of novel cultivable bacteria
876 isolated from marine sponge *Tedania anhelans*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 31, 581–590.
877 doi:10.1007/s00343-013-2223-y.
- 878 Zhang, H., Lee, Y. K., Zhang, W., and Lee, H. K. (2006). Culturable *Actinobacteria* from the Marine
879 Sponge *Hymeniacidon perlevei*: Isolation and Phylogenetic Diversity by 16S rRNA gene-RFLP
880 Analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 159–169. doi:10.1007/s10482-006-9070-1.
- 881 Zhang, W., Li, Z., Miao, X., and Zhang, F. (2009a). The Screening of Antimicrobial Bacteria with
882 Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China Sea Sponges.
883 *Mar. Biotechnol.* 11, 346–355. doi:10.1007/s10126-008-9148-z.
- 884 Zhang, W., Zhang, F., Li, Z., Miao, X., Meng, Q., and Zhang, X. (2009b). Investigation of bacteria with
885 polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *J.*
886 *Appl. Microbiol.* 107, 567–575. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04241.x.
- 887 Zumberge, J. A., Love, G. D., Cárdenas, P., Sperling, E. A., Gunasekera, S., Rohrsen, M., et al. (2018).
888 Demosponge steroid biomarker 26-methylstigmastane provides evidence for Neoproterozoic animals.
889 *Nat. Ecol. Evol.* 2, 1709–1714. doi:10.1038/s41559-018-0676-2.