



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

RAFAEL DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E  
BIOTECNOLÓGICA DE 10 MAGS DO FILO  
LATECIBACTEROTA RECUPERADOS DO  
MICROBIOMA DE ESPONJAS DO RECIFE AMAZONAS**

BRASÍLIA

2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

RAFAEL DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E  
BIOTECNOLÓGICA DE 10 MAGS DO FILO  
LATECIBACTEROTA RECUPERADOS DO  
MICROBIOMA DE ESPONJAS DO RECIFE AMAZONAS**

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

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

BRASÍLIA

2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

RAFAEL DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE 10  
MAGS RECUPERADOS DO MICROBIOMA DE ESPONJAS DO RECIFE  
AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Universidade de Brasília

---

Dr. Fabyano Alvares Cardoso Lopes  
Universidade Federal do Tocantins

---

Dr. Robert Neil Gerard Miller  
Universidade de Brasília

---

Dr. Ricardo Henrique Krüger  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

Dedico esse pequeno espaço para todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha vida acadêmica.

Agradeço a toda minha família que acompanha a minha trajetória e deu o apoio necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço especialmente aos meus pais, Helena e Leonardo, que sempre me dão apoio e me ajudam nos momentos que mais necessito, e ao meu irmão, Tiago, que além de todo o suporte, é uma constante fonte de inspiração, sendo o maior incentivo a continuar na dura vida acadêmica.

Agradeço aos meus amigos, em especial o Alan, Guilherme, Vitor, Eric e Lucas, que conheço desde a época do Marista e me aturam até hoje, tanto nos momentos bons como nos ruins, e são como uma segunda família para mim. Agradeço ainda ao Jônathas, Vitor, Elthon e Flávio, amigos que conheci através do meu irmão e hoje considero como parte dessa grande família de amigos.

Agradeço ao meu orientador, Ricardo Krüger, que me aceitou e acolheu tão bem em sua equipe, mesma nas condições peculiares que perduram até a atualidade, e ainda me confiou a realização deste trabalho. Agradeço também a todos os integrantes do laboratório do Krüger que ajudaram bastante no desenvolvimento deste trabalho com seus conselhos e opiniões, principalmente o Otávio, que ajudou imensamente em todas as etapas deste trabalho, e me iniciou na bioinformática, sem ele eu não teria chegado até aqui. Infelizmente, por conta do terrível período pandêmico, nossas interações ficaram restritas ao âmbito virtual, mas foi ótimo conhecê-los e é uma honra participar de um grupo tão especial como o de vocês.

Agradeço a todos os colegas, professores e funcionários que participaram da minha trajetória universitária, na graduação ou na pós-graduação, e contribuíram para minha formação acadêmica e profissional. É um agradecimento especial para Samuel, meu orientador na época da graduação, e Lídia, querida professora da UCB, que me auxiliaram bastante a seguir no meio acadêmico e começar o Mestrado.

## RESUMO

As esponjas e seus organismos associados possuem grande importância no ambiente marinho, atuando em diversos processos ecológicos. Eles ainda são uma fonte relevante de compostos bioativos que podem ser explorados biotecnologicamente. O Recife Amazonas é uma região peculiar que abriga enorme diversidade de seres vivos. O local é marcado pela vazão de água e sedimentos vindos do Rio Amazonas, formando uma pluma de sedimentos que impacta parâmetros físico-químicos e os organismos habitantes. Tendo isso em mente, foi feita a análise, através de métodos de bioinformática, de aspectos genéticos e metabólicos de 10 MAGs oriundos da microbiota de esponjas do Recife Amazonas com o intuito de saber sobre as possíveis contribuições desses microrganismos para o ecossistema e o hospedeiro e sobre a possibilidade de uso biotecnológico. O projeto iniciou com a coleta de amostras de tecido de esponjas do recife, seguida pela extração e sequenciamento do DNA metagenômico. A partir dele, foram recuperados mais de 200 MAGs de boa qualidade, sendo escolhidos 10, com base em classificações preliminares, para análise mais detalhada. Em seguida, foram desenvolvidos os seguintes procedimentos *in silico*: determinação da qualidade dos genomas e da similaridade entre eles, definição da taxonomia, reconstrução metabólica e busca por compostos bioativos. Todos os MAGs apresentaram qualidade entre média e alta, com contaminação abaixo de 10% e completude acima de 70%. Valores de ANI e dDDH indicam que dois pares de MAGs provavelmente pertencem à mesma espécie. Além disso, os MAGs foram classificados no mesmo filo, Latescibacterota, e classe, UBA2968. A reconstrução metabólica demonstrou a presença de genes relacionados à heterotrofia, com processos aeróbicos e anaeróbicos para obtenção de energia. A identificação de genes envolvidos nas vias de biorremediação e nos ciclos do nitrogênio, enxofre e fósforo mostram possíveis contribuições para o recife. Genes ligados à síntese de nutrientes e outros produtos úteis, à desintoxicação de metais pesados, e à defesa química foram encontrados, indicando possíveis benefícios ao hospedeiro. Do ponto de vista biotecnológico, os MAGs contêm alguns genes ligados à produção de metabólitos secundários e que codificam enzimas de interesse comercial e industrial. Também foram identificados peptídeos bioativos que possuem diversas propriedades. Assim, esse trabalho mostrou possíveis papéis desses microrganismos no recife, possíveis benefícios às esponjas, além de formas de exploração biotecnológica.

Palavras-chave: Bioinformática; Metagenoma; Microbioma; Symbiote de esponjas.

## ABSTRACT

Sponges and their associated organisms have significant importance in the ocean due to their role in many ecological processes. They also are a relevant source of bioactive compounds which can be explored biotechnologically. The Amazon Reef is a peculiar area that hosts a huge diversity of species. This place is characterized by the leakage of water and sediments from the Amazon River, generating a plume of sediments that impacts physical-chemical parameters and living organisms. Having this in mind, an analysis of genetic and metabolic features of 10 MAGs derived from Amazon Reef sponges' microbiome, through bioinformatics methods. The main objective was to show possible contributions these microorganisms might give to the ecosystem and its host and discover possible biotechnology uses. The project began with reef sponge tissue collection, followed by DNA extraction and sequencing. Over 200 MAGs of good quality were recovered from the metagenomic DNA. 10 of those MAGs were selected for more detailed analyses based on preliminary classifications. Then the following procedures were executed: definition of genomes quality and their similarity, taxonomic classification, metabolic reconstruction, and search for bioactive compounds. All MAGs presented quality between average and high. Contamination was lower than 10%, and completeness was higher than 10%. ANI and dDDH results indicate that two pairs of MAGs probably belong to the same species. Besides, MAGs were taxonomically assigned in the same phylum, Latescibacterota, and class, UBA2968. Metabolic reconstruction demonstrated the presence of genes related to heterotrophy with both aerobic and anaerobic processes for energy acquisition. Identification of genes involved in bioremediation pathways and nitrogen, sulfur, and phosphorus cycles show possible contributions to the reef. Genes related to the synthesis of essential nutrients and other useful products, heavy metals detox and chemical defense were also found, indicating possible benefits for the host. From a biotechnological point of view, MAGs have some genes linked to secondary metabolite production while others generate commercial and industrial enzymes. Biologically active peptides with distinct properties were identified as well. Therefore, this work shows possible roles for these microorganisms on the reef along with possible benefits for the sponges. They could also be biotechnologically explored in diverse ways.

Keywords: Bioinformatics; Metagenome; Microbiome; Sponge's symbiont.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimentos mais relevantes desenvolvidos em estudos com metagenoma. A abordagem funcional e estrutural são as principais estratégias usadas para explorar aspectos ecológicos e biotecnológicos de amostras do ambiente.....17
- Figura 2.** Anatomia geral das esponjas. Comunidades de microrganismos diversos podem ser encontradas no meso-hilo. Retirado e adaptado de Hentschel *et al.* (2012)..... 19
- Figura 3.** Interações entre esponjas e seus simbioses podem trazer benefícios e malefícios aos dois. Simbioses podem auxiliar no desenvolvimento da esponja ou causar danos a ela. Por outro lado, o hospedeiro pode contribuir ou atrapalhar o crescimento de microrganismos associados.....22
- Figura 4.** Mapa do Recife Amazonas mostrando sua área, as mudanças sazonais na extensão da pluma e pontos de interesse como locais de pesca e recifes. Retirado e adaptado de Moura *et al.* (2016)..... 25
- Figura 5.** Região onde as amostras foram coletadas. O quadrado vermelho indica o ponto aproximado da coleta. Retirado e adaptado do Google Earth..... 29
- Figura 6.** Árvore filogenética mostrando a relação entre os MAGs, destacados de vermelho, com outros organismos próximos dos filos Latescibacterota e Gemmatimonadetes, identificados com o nome dado no NCBI. A raiz da árvore está no *outgroup*, formado por genomas do filo Firmicutes. As expressões após os parênteses indicam o filo atribuído enquanto a cor de fundo indica a classe..... 39
- Figura 7.** Domínios relacionados às proteínas similares às eucarióticas encontrados nos MAGs através do programa Panzzer2. ANK = repetição de anquirina; FN3 = fibronectina tipo-III; LRR = repetição rica em leucina; NHL = repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41; SEL1 = repetição similar a SEL1; PQQ = repetição de pirroloquinolina quinona; TPR = repetição de tetratricopeptídeo; WD40 = repetição de WD40..... 42

**Figura 8.** Domínios relacionados às proteínas similares às eucarióticas encontrados nos MAGs através do programa CD-Search. ANK = repetição de anquirina; LRR = repetição rica em leucina; NHL = repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41; SEL1 = repetição similar a SEL1; TPR = repetição de tetratricopeptídeo; WD40 = repetição de WD40..... 42

**Figura 9.** Mapa de calor mostrando as vias possivelmente realizados por cada MAG, além da porcentagem de reações possivelmente realizadas por ele com relação ao total de reações das vias, tendo como referência a base de dados KEGG ou MetaCyc. Nesses gráficos, são apresentados dados da reconstrução metabólica sobre a biossíntese de vários tipos de compostos, mecanismos de defesa, fatores de patogenicia, vias de biorremediação e metabolismo energético..... 43

**Figura 10.** Mapa de calor mostrando as vias possivelmente realizados por cada MAG, além da porcentagem de reações possivelmente realizadas por ele com relação ao total de reações das vias, tendo como referência a base de dados KEGG ou MetaCyc. Nesses gráficos, são apresentados dados da reconstrução metabólica sobre a degradação de vários tipos de compostos..... 45

**Figura 11.** Processos do ciclo nitrogênio possivelmente realizados pelas bactérias em estudo. Os símbolos indicam a presença, em determinado MAG indicado, de certo gene envolvido em alguma etapa do ciclo. Nota-se o possível envolvimento nos processos de nitrificação, redução do nitrato e assimilação da amônia..... 46

**Figura 12.** Processos do ciclo enxofre possivelmente realizados pelas bactérias em estudo. Os símbolos indicam a presença, em determinado MAG indicado, de certo gene envolvido em alguma etapa do ciclo. Nota-se o possível envolvimento nos processos de assimilação e dissimilação do sulfato, desproporcionamento do tiosulfato e incorporação do sulfeto..... 47

**Figura 13.** Resultado do antiSMASH mostrando a quantidade de clusters gênicos relacionados à produção de determinado tipo de metabólito secundário, encontrados em cada MAG. Cada



cor indica um tipo de cluster. Em um dos MAGs, nenhum cluster foi identificado. NRPS-like = proteína similar à sintase de peptídeos não ribossomais; LAP = peptídeo linear contendo azol ou azolina; T1PKS = policetídeo sintase tipo I; RRE = peptídeo contendo elemento de reconhecimento de RiPP; RiPP-like = outros tipos de peptídeo sintetizado no ribossomo e modificado após a tradução..... 51

**Figura 14.** Resultado da busca por enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos na base de dados CAZy, feita no dbCAN2. As barras mostram a quantidade genes encontrados para cada classes de enzimas, com cada cor distinta representando uma classe. A linha azul mostra a quantidade de genes que possuem peptídeo-sinal. GH = hidrolase glicosídica; GT = glicosiltransferase; PL = polissacarídeo liase; CE = carboidrato esterase; CBM = módulo de ligação ao carboidrato..... 53

**Figura 15.** Quantidade de sequências com menos de 100 resíduos encontradas em cada MAG, indicada pela barra verde, e a quantidade de peptídeos que foram designados como biologicamente ativos pelo programa PeptideRanker, indicado pela linha amarela. BAP = peptídeo biologicamente ativo..... 54

**Figura 16.** Atividades biológicas previstas nos peptídeos encontrados. Peptídeos com mais de um tipo de atividade prevista foram designados como "Vários". Peptídeos com resultado negativo em todos programas foram designados como "Desconhecida". BAP = peptídeo biologicamente ativo..... 54

**Figura 17.** Todas as possíveis contribuições dos MAGs para a esponja e o ecossistema onde habitam..... 67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista com os identificadores utilizados para distinguir os MAGs.....	31
<b>Tabela 2.</b> Lista com o nome e o número EC de todas as enzimas procuradas nos genomas analisados.....	35
<b>Tabela 3.</b> Programas utilizados para prever a função de peptídeos biologicamente ativos...	36
<b>Tabela 4.</b> Métricas dos MAGs obtidas através do programa GenomeQC.....	37
<b>Tabela 5.</b> Métricas dos MAGs obtidas com os programas CheckM, CoverM e Prokka.....	37
<b>Tabela 6.</b> Qualidade dos MAGs determinadas com base em Bowers et al. (2017).....	38
<b>Tabela 7.</b> Classificação taxonômica realizada pelo programa GTDB-tk.....	38
<b>Tabela 8.</b> Resultado da verificação de similaridade entre genomas por meio do ANI, calculado no servidor JspeciesWS.....	40
<b>Tabela 9.</b> Resultado da verificação de similaridade entre genomas por meio do dDDH, calculado pelo programa GGDC.....	41
<b>Tabela 10.</b> Genes que codificam transportadores encontrados nos MAGs.....	49
<b>Tabela 11.</b> Genes relacionados à produção de antibióticos encontrados nos MAGs.....	50
<b>Tabela 12.</b> Genes relacionados à resistência contra antibióticos encontrados nos MAGs.....	50
<b>Tabela 13.</b> Genes para enzimas de interesse biotecnológico encontrados nos MAGs.....	52
<b>Tabela 14.</b> Membros da classe UBA2968 do filo Latescibacterota.....	56

<b>Tabela 15.</b> Genes para enzimas ligadas à degradação de contaminantes encontrados nos MAGs, além de informações sobre a poluição causada e alguns de seus efeitos.....	65
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

<b>2,4-D:</b> <i>2,4-Dichlorophenoxyacetic acid</i> / Ácido diclorofenoxiacético	<b>DNA:</b> <i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
<b>3HP:</b> 3-Hidroxipropionato	<b>DNRA:</b> <i>Dissimilatory nitrate reduction to ammonium</i> / Redução dissimilatória de nitrato à amônia
<b>4HB:</b> 4-Hidroxibutirato	
<b>AA:</b> Atividade auxiliar	
<b>ANI:</b> <i>Average nucleotide identity</i> / Identidade média de nucleotídeos	<b>EC:</b> <i>Enzyme Commission</i> / Comitê de Enzimas
<b>ANK:</b> <i>Ankyrin repeat</i> / Repetição de anquirina	<b>EDTA:</b> <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilendiamino tetra-acético
<b>Annamox:</b> <i>Anaerobic ammonium oxidation</i> / Oxidação anaeróbica da amônia	<b>ELP:</b> <i>Eucaryotic-like protein</i> / Proteína similar às de eucariotos
<b>AOB:</b> <i>Ammonia oxidizing bacterium</i> / Bactéria conversora de amônia	<b>FN3:</b> <i>Fibronectin type III repeat</i> / Repetição de fibronectina tipo-III
<b>BAP:</b> <i>Biologically active peptide</i> / Peptídeo biologicamente ativo	<b>GC:</b> Guanina e citosina
<b>CAZy:</b> <i>Carbohydrate Active Enzymes</i> / Enzimas Ativas em Carboidratos	<b>GH:</b> <i>Glycoside hydrolases</i> / Hidrolase glicosídica
<b>CBM:</b> <i>Carbohydrate-binding modules</i> / Módulo de ligação ao carboidrato	<b>GT:</b> Glicosiltransferase
<b>CDS:</b> <i>Coding DNA sequence</i> / Região de codificação	<b>GTDB:</b> <i>Genome Taxonomy Database</i> / Base de dados de Taxonomia de Genomas
<b>CE:</b> Carboidrato esterase	<b>KEGG:</b> <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> / Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto
<b>CRISPR:</b> <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> / Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas	<b>KO:</b> <i>KEGG orthology</i> / Ortologia do KEGG
<b>DC:</b> <i>Dicarboxylate</i> / Ácido dicarboxílico	<b>LAP:</b> <i>Linear azol(in)e-containing peptides</i> / Peptídeo linear contendo azol ou azolina
<b>dddH:</b> <i>Digital DNA-DNA hybridization</i> / Hibridização digital de DNA-DNA	<b>Lat:</b> Latitude
	<b>Long:</b> Longitude
	<b>LRR:</b> <i>Leucine-rich repeat</i> / Repetição rica em leucina

<b>MAG:</b> <i>Metagenome-assembled genome</i> / Genoma montado a partir de metagenoma	<b>RNA:</b> <i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
<b>MCPA:</b> <i>2-Methyl-4-chlorophenoxyacetic acid</i> / Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético	<b>ROS:</b> <i>Reactive oxygen species</i> / Espécies reativas de oxigênio
<b>NGS:</b> <i>Next generation sequencing</i> / Sequenciamento de nova geração	<b>RRE:</b> <i>RiPP recognition element containing cluster</i> / Cluster contendo elemento de reconhecimento de RiPP
<b>NHL:</b> <i>NCL-1, HT2A and Lin-41 repeat</i> / Repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41	<b>rRNA:</b> <i>Ribosomal RNA</i> / RNA ribossomal
<b>NRPS-like:</b> <i>NRPS-like fragment</i> / Proteína similar à NRPS	<b>SEL1:</b> <i>Sell-like repeat protein</i> / Repetição similar a SEL1
<b>NRPS:</b> <i>Non-ribosomal peptide synthetase</i> / Sintase de peptídeos não ribossomais	<b>SRB:</b> <i>Sulfate-reducing bacterium</i> / bactéria redutora de sulfato
<b>PBDE:</b> <i>Polybrominated diphenyl ether</i> / éter difenílico polibromado	<b>SSU:</b> <i>Small subunit</i> / Subunidade menor
<b>PL:</b> Polissacarídeo liase	<b>T1PKS:</b> <i>Type I polyketide synthase</i> / Policetídeo sintase tipo I
<b>PQQ:</b> <i>Pyrrolo-quinoline quinone repeat</i> / Repetição de pirroloquinolina quinona	<b>tmRNA:</b> <i>Transfer-messenger RNA</i> / RNA de transferência-mensageiro
<b>R-M:</b> <i>Restriction-modification</i> / Restrição e modificação	<b>TPR:</b> <i>Tetratricopeptide repeat</i> / Repetição de tetratricopeptídeo
<b>RiPP-like:</b> <i>Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide</i> / Outros tipos de peptídeo sintetizado no ribossomo e modificado após a tradução	<b>tRNA:</b> <i>Transporter RNA</i> / RNA transportador
	<b>WD40:</b> <i>WD40 repeat</i> / Repetição de WD40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. METAGENOMA .....	16
1.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE ESPONJAS E BACTÉRIAS .....	18
1.3. RECIFE AMAZONAS .....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. OBTENÇÃO DO DNA METAGENÔMICO .....	29
4.1.1. Coleta de amostras .....	29
4.1.2. Extração do DNA .....	29
4.2. RECUPERAÇÃO DE MAGS .....	30
4.2.1. Sequenciamento e montagem .....	30
4.2.2. Recuperação dos MAGs .....	30
4.3. DESCRIÇÃO DOS MAGS .....	31
4.3.1. Métricas dos genomas e qualidade dos MAGs .....	31
4.3.2. Classificação taxonômica.....	32
4.3.3. Domínios similares aos eucarióticos .....	33
4.4. RECONSTRUÇÃO METABÓLICA .....	33
4.5. BUSCA POR COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO .....	34
4.5.1. Enzimas de interesse biotecnológico.....	34
4.5.2. Metabólitos secundários .....	35
4.5.3. Peptídeos biologicamente ativos .....	36
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
5.1. DESCRIÇÃO DOS MAGS .....	37
5.1.1. Métricas dos genomas e qualidade dos MAGs .....	37
5.1.2. Classificação taxonômica.....	38
5.1.3. Domínios similares aos eucarióticos .....	41
5.2. RECONSTRUÇÃO METABÓLICA .....	43
5.2.1. Metabolismos energético e fixação do carbono .....	43
5.2.2. Nutrição e biossíntese.....	45

5.2.3. Ciclos biogeoquímicos.....	46
5.2.4. Biorremediação .....	47
5.2.5. Mecanismos bacterianos de defesa e outras características.....	48
5.2.7. Resistência e produção de antibióticos.....	49
5.3. COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	51
5.3.3. Compostos bioativos .....	51
5.3.2. Enzimas de interesse biotecnológico.....	51
5.3.3. Peptídeos biologicamente ativos .....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
6.1. ANÁLISE FILOGENÔMICA .....	55
6.1.1. Qualidade dos MAGs.....	55
6.1.2. Classificação taxonômica.....	55
6.2. METABOLISMO .....	56
6.2.1. Metabolismo energético e fixação do carbono.....	56
6.2.2. Biossíntese .....	57
6.2.3. Outras Características .....	58
6.3. ASSOCIAÇÃO COM ESPONJAS.....	58
6.3.1. Simbiose .....	58
6.3.2. Nutrição.....	59
6.3.3. Defesa .....	60
6.3.4. Desintoxicação .....	61
6.3.5. Patogenia.....	61
6.4. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA .....	62
6.4.1. Ciclos biogeoquímicos.....	62
6.4.2. Relações ecológicas.....	64
6.4.3. Biorremediação .....	65
6.5. INTERESSE BIOTECNOLÓGICO .....	68
6.5.1. Metabólitos secundários .....	68
6.5.2. Enzimas de relevância biotecnológica .....	70
6.5.3. Peptídeos biologicamente ativos .....	71
<b>7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

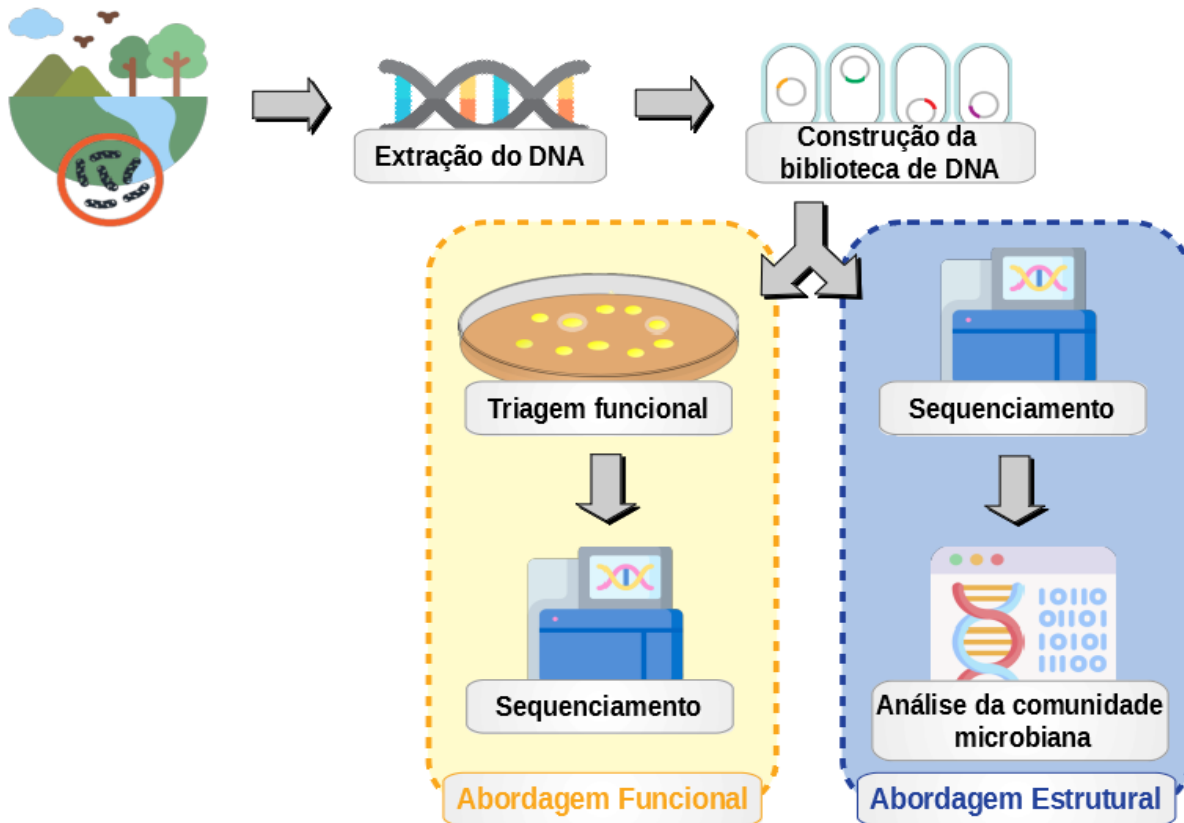
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. METAGENOMA

Metagenoma se refere ao conjunto de material genético, de diferentes organismos, presente em uma amostra de um determinado ambiente. A metagenômica consiste no estudo de uma coleção de genomas derivados de uma comunidade de organismos, através de dados obtidos durante o sequenciamento (ZHANG *et al.*, 2021). Embora a ideia de analisar o DNA vindo de uma amostra ambiental tenha sido proposta em 1986 por Pace e colaboradores, a primeira biblioteca metagenômica só veio a ser gerada 5 anos depois, no trabalho de Schimdt *et al.*, em 1991, com plânctons marinhos. O termo “metagenoma” nasceu anos depois, cunhado por Handelsman e colaboradores enquanto verificavam o potencial biotecnológico de organismos do solo (ALVES *et al.*, 2018). A metagenômica possibilitou o estudo de organismos sem a necessidade de cultivá-los, permitindo a descoberta de novas espécies e de produtos biotecnológicos (HANDELSMAN, 2004). Porém, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a metagenômica só foi possível com a evolução das metodologias de sequenciamento. As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), como as da plataforma Illumina e IonTorrent, permitiram a obtenção de informações acerca de sequências de DNA de maneira mais rápida e acessível, quando comparadas ao método de Sanger (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015).

Atualmente, a metagenômica é separada em duas abordagens principais: funcional e estrutural (**Figura 1**). A primeira é usada para descobrir novas substâncias bioativas e genes de interesse, por meio da expressão de bibliotecas. Na outra, o foco do estudo é a composição da população microbiana, envolvendo estudos sobre diversidade e abundância da comunidade, classificação taxonômica dos organismos, além da identificação do papel biológico e ecológico dos membros (ALVES *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021). Por meio desta abordagem é possível recuperar genomas montados a partir do metagenoma (MAG) que podem ser utilizados para identificar espécies novas e predizer a função ecológica do organismo. Um MAG consiste no agrupamento de *scaffolds*, com base na frequência de tetranucleotídeos, abundância, genes marcadores, alinhamentos taxonômicos e na ocorrência de códons, de forma que a montagem represente o genoma de um organismo (YANG *et al.*, 2021).





**Figura 1.** Principais procedimentos desenvolvidos em estudos com metagenoma. A abordagem funcional e estrutural são as principais estratégias usadas para explorar aspectos ecológicos e biotecnológicos de amostras do ambiente.

O estudo do metagenoma de um determinado ambiente tem início com a extração e enriquecimento do material genético presente na amostra. Em seguida, é feita a construção da biblioteca metagenômica ao clivar o material genético em partes, clonar as sequências em um vetor, e inserir este vetor em uma célula, transformando-a em um hospedeiro viável. Depois, na abordagem funcional, é feita a triagem para identificar genes de interesse, e posterior sequenciamento, que pode ser realizado tanto diretamente na amostra como específico para genes-alvo. Na abordagem estrutural, é realizado o sequenciamento de todos os genomas da amostra. Procede-se, então, ao processamento dos dados gerados durante o sequenciamento, incluindo a montagem das sequências, predição e anotação de genes, classificação taxonômica, e reconstrução metabólica (DIAS *et al.*, 2014; ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015; PÉREZ-COBAS; GOMEZ-VALERO; BUCHRIESER, 2020; ZHANG *et al.*, 2021).

A metagenômica pode ser aplicada em diversas áreas do conhecimento, entre elas a agricultura, energia, ecologia, medicina, meio ambiente e indústria (ZHANG *et al.*, 2021). A

partir do metagenoma, é possível encontrar genes inéditos que codificam enzimas de interesse industrial como lipases, proteases, celulasas e pectinase, além de permitir a descoberta de novos compostos bioativos e antibióticos, tal como visto na obtenção de uma enzima lipolítica a partir de solos do cerrado (BASHIR; SINGH; KONWAR, 2014; ISTVAN *et al.*, 2018). Também pode ser utilizada visando a biorremediação, incluindo usos no tratamento de esgoto e na prevenção e controle da poluição, através da degradação de poluentes e produção de biossurfactantes (BASHIR; SINGH; KONWAR, 2014; ZHANG *et al.*, 2021). Um exemplo dessa aplicação pode ser visto no isolamento de uma cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* capaz de degradar polietileno a partir do metagenoma de um solo (FREDERICO *et al.*, 2021). A metagenômica ainda pode ser utilizada na inferência do papel ecológico de microrganismos, por exemplo, a relação de simbiose com outros organismos e a participação em ciclos biogeoquímicos, como na contribuição de microrganismos no processo de fixação do nitrogênio no cerrado (SILVEIRA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Outras aplicações possíveis consistem na detecção de patógenos e de genes de resistência e na comparação do microbioma de uma determinada amostra em condições distintas, como poder ser visualizado em trabalhos sobre a comunidade de arqueias e bactérias provenientes da savana brasileira (SANTOS *et al.*, 2016; BELMOK *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021).

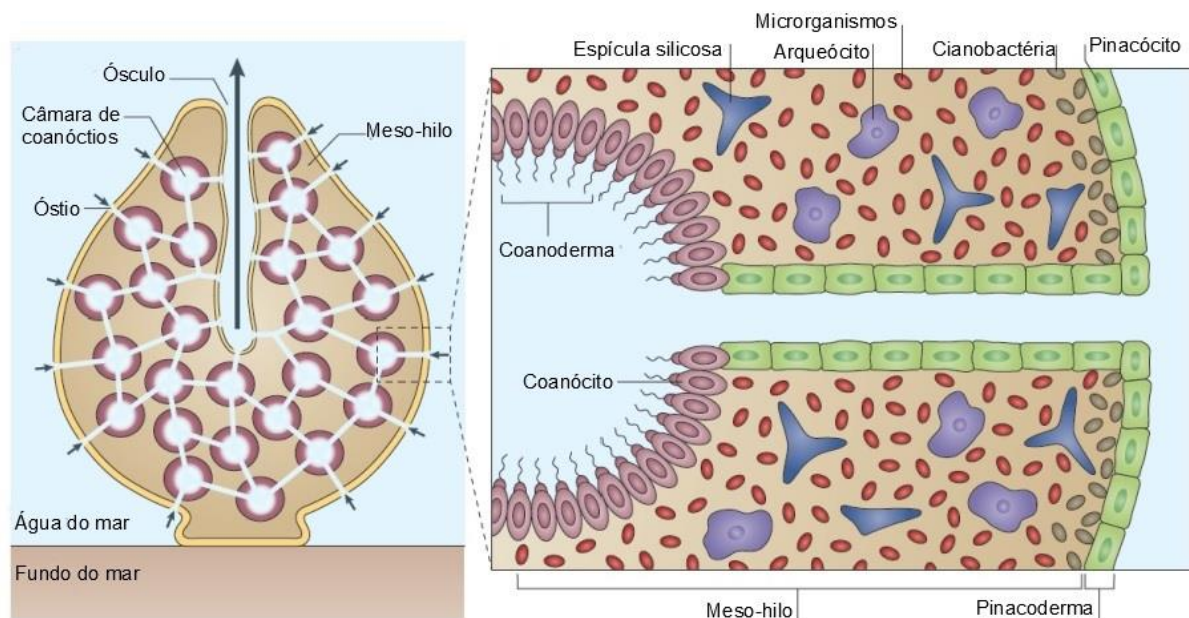
Estudos de metagenoma podem ser realizados em diferentes tipos de amostras, por exemplo, solo, água e tecidos. Os locais de coleta também são bastante variados, abrangendo desde o oceano, lagos e recifes até minas e fezes de animais. Essas localizações podem apresentar ainda características peculiares como temperaturas e acidez elevadas (VIEITES *et al.*, 2008). Uma amostra de grande interesse é o tecido de esponjas, devido ao potencial biotecnológico da sua microbiota (STOREY *et al.*, 2020). Existem vários trabalhos envolvendo à análise do metagenoma de esponjas, tanto sob um ponto de vista ecológico, com o intuito de evidenciar possíveis papéis biológicos dos microrganismos (SLABY *et al.*, 2017; MORENO-PINO *et al.*, 2020), como numa perspectiva biotecnológica, para identificar novos produtos naturais que possam ter alguma aplicabilidade (NAKASHIMA *et al.*, 2016; STOREY *et al.*, 2020).

## 1.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE ESPONJAS E BACTÉRIAS

As esponjas são animais invertebrados pertencentes ao filo Porifera que habitam águas salgadas e doces em regiões temperadas, tropicais e polares. Elas são organismos sésseis

capazes de filtrar a água em busca de alimento, consumindo micróbios e partículas dissolvidas de carbono, presentes na água (TAYLOR *et al.*, 2007; HENTSCHEL; USHER; TAYLOR, 2016). Atualmente, sabe-se da existência de mais de 8.000 espécies de esponjas que podem apresentar diferentes formas, cores e tamanhos (RENARD *et al.*, 2013; HENTSCHEL; USHER; TAYLOR *et al.*, 2016). Os membros desse filo são separados, conforme as características teciduais, esqueléticas e de desenvolvimento, em quatro classes: Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida e Homoscleromorpha (RENARD *et al.*, 2013). Esponjas têm sido alvo de grande interesse devido à sua associação com microrganismos e à produção de metabólitos secundários (TAYLOR *et al.*, 2007).

As esponjas são formadas por diversas estruturas, entre elas a pinacoderma, superfície externa formada por células epiteliais (pinacócitos); óstio, orifícios na superfície que se estendem em canais interiores; coanoderma, composta por células flageladas (coanócitos) que bombeiam e filtram a água que passa através do óstio; e meso-hilo, camada de tecido conjuntivo onde ocorre a digestão das partículas de alimento via fagocitose dos arqueócitos (**Figura 2**). O meso-hilo ainda alberga uma comunidade diversa de microrganismos (TAYLOR *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Anatomia geral das esponjas. Comunidades de microrganismos diversos podem ser encontradas no meso-hilo. Retirado e adaptado de Hentschel *et al.* (2012).

As esponjas podem ser consideradas um holobionte, formado pelo hospedeiro (esponja) junto aos organismos associados a ele, que podem ser encontrados dentro ou fora das células (BIBI *et al.*, 2017; PITA *et al.*, 2018). Essa associação não influencia apenas os simbioses e os

hospedeiros, impactando também os recursos biogeoquímicos e ecológicos (KIRAN *et al.*, 2018). Com relação à comunidade de organismos simbioses, esses seres podem ser classificados em esponjas de alta abundância microbiana e de baixa abundância microbiana. Enquanto as primeiras apresentam uma quantidade de bactérias na ordem de  $10^8$  a  $10^{10}$  por grama da esponja, as outras têm uma concentração de bactérias similar à da água (entre  $10^5$  e  $10^6$  de bactérias por grama) (THACKER e FREEMAN, 2012; HENTSCHEL; USHER; TAYLOR, 2016). Essa distinção é reflexo de diferenças morfológicas encontradas nesses grupos (e.g. densidade dos tecidos), que culminam em maior ou menor bombeamento de água (THACKER e FREEMAN, 2012; PAUL; FREEMAN; AGARWAL, 2019).

A microbiota associada das esponjas engloba vírus, bactérias, arqueias e eucariotos unicelulares, podendo corresponder a até 40% do seu volume total (TAYLOR *et al.*, 2007; WEBSTER e TAYLOR, 2012; KIRAN *et al.*, 2018). Atualmente, acredita-se que as esponjas obtenham simbioses por: transmissão vertical, em que organismos presentes no pai são passados à prole durante o processo reprodutivo; transmissão horizontal, na qual os microrganismos do ambiente aquático passam a compor a microbiota da esponja; ou a combinação dos mecanismos de transmissão vertical e horizontal (TAYLOR *et al.*, 2007).

As comunidades de microrganismos associados às esponjas apresentam alta diversidade com uma gama de bactérias distintas ligada a uma espécie (TAYLOR *et al.*, 2007). Tal diversidade abrange desde bactérias isoladas e cultivadas, como espécies dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Verrumicrobia, até bactérias ainda não cultivadas, como membros dos filos Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes e Nitrospira, incluindo representantes de filos candidatos, por exemplo, os filos Poribacteria e Tectomicrobia (TAYLOR *et al.*, 2007; KIRAN *et al.*, 2018). Essa comunidade de bactérias é composta tanto por microrganismos generalistas, encontrados na maioria das esponjas de uma espécie ainda que vindas de regiões distintas, quanto por microrganismos especialistas, que estão enriquecidos em determinada espécie, mas ausentes ou reduzidos em outras. Há também grupos de bactérias específicos de esponjas, ou seja, microrganismos achados apenas em esponjas, mesmo tendo relações filogenéticas distantes ou sendo de diferentes localidades (TAYLOR *et al.*, 2007; BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; PITA *et al.*, 2018).

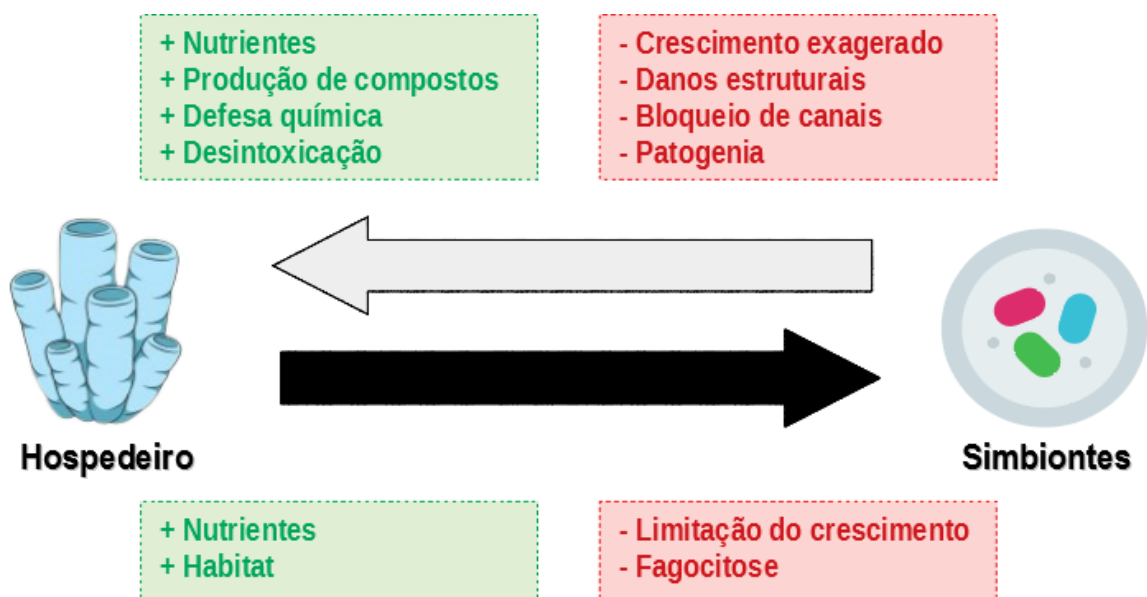
As comunidades geralmente são bastante estáveis no tempo e espaço, sendo resistentes às alterações no ambiente como mudanças de profundidade e de estações do ano, distância geográfica, habitat, inanição, e exposição a antibióticos (KIRAN *et al.*, 2018; PITA *et al.*, 2018).

Mesmo assim, condições ambientais e fatores do hospedeiro ainda podem provocar alterações na microbiota, especialmente na comunidade variável (KIRAN *et al.*, 2018; PITA *et al.*, 2018). Há também diferenças significativas nas comunidades de espécies distintas (TAYLOR *et al.*, 2007).

As interações entre microrganismos e esponjas podem ser tanto benéficas como prejudiciais ao hospedeiro (**Figura 3**). Os microrganismos podem ajudar a esponja na aquisição de nutrientes, servindo como alimento ou produzindo compostos utilizados pelo hospedeiro. Além disso, eles contribuem na eliminação de substâncias tóxicas e proteção contra predadores e patógenos por meio de metabólitos secundários (OSINGA *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2007). Por outro lado, os simbioses ganham uma fonte de nutrientes, obtidos pelas atividades de filtração, e um abrigo contra predadores e luz (TAYLOR *et al.*, 2007; SELVIN *et al.*, 2010). Quanto aos efeitos deletérios, microrganismos podem afetar o hospedeiro tanto diretamente, atuando como parasita ou patógeno e causando danos a sua estrutura esquelética, como indiretamente, através da formação de biofilme que promove a incrustação da superfície, podendo resultar no bloqueio de canais e no deslocamento da esponja (TAYLOR *et al.*, 2007; THACKER e FREEMAN, 2012). A maior parte das doenças causadas às esponjas foi genericamente atribuída a bactérias e fungos, havendo poucos casos em que o agente causador fora identificado (TAYLOR *et al.*, 2007). Já as esponjas produzem substâncias inibidoras e seletivas que moldam a microbiota, além de poderem consumir os simbioses para adquirir nutrientes (TAYLOR *et al.*, 2007; THACKER e FREEMAN, 2012) Há ainda interações entre os microrganismos da comunidade, com prevalência de interações unidirecionais, como amensalismo e comensalismo, em detrimento de interações bidirecionais, entre elas cooperação e competição, o que favorece a estabilização da comunidade (PITA *et al.*, 2018).

Outro fator importante para o estabelecimento da simbiose está relacionado à imunidade. As esponjas são capazes de controlar seu microbioma por meio da imunidade inata, escolhendo quais microrganismos persistirão e diferenciando os organismos estranhos dos simbioses (PITA *et al.*, 2018). Acredita-se que os simbioses conseguem escapar da atividade imune pelo reconhecimento específico deles ou uso de cápsulas extracelulares que evitam o seu reconhecimento (TAYLOR *et al.*, 2007). Um mecanismo especialmente importante refere-se à expressão de proteínas similares às eucarióticas (ELP), que contêm domínios eucarióticos envolvidos na interação proteína-proteína em sua estrutura. Essas proteínas também modulam a interação entre o hospedeiro e sua microbiota, estando possivelmente envolvidos na simbiose ou patogenicidade de alguns microrganismos (WEBSTER e THOMAS, 2016; DÍEZ-VIVES *et*

*al.*, 2017; MONDINO, SCHMIDT e BUCHRIESER, 2020). Outros mecanismos, como atividades de antibiose e *quorum sensing*, podem contribuir na seleção dos simbios e colonização de microrganismos (TAYLOR *et al.*, 2007; SELVIN *et al.*, 2010). As esponjas também dispõem de maneiras para controlar a quantidade de organismos associados, entre elas a inanição, em que a esponja restringe o acesso do simbiote a nutrientes essenciais, e o sequestro de substâncias ligadas à fotossíntese. Outros mecanismos propostos, mas não evidenciados, são o consumo dos simbios excedentes e a expulsão deles em situação de estresse (TAYLOR *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Interações entre esponjas e seus simbios podem trazer benefícios e malefícios aos dois. Simbios podem auxiliar no desenvolvimento da esponja ou causar danos a ela. Por outro lado, o hospedeiro pode contribuir ou atrapalhar o crescimento de microrganismos associados.

Microrganismos associados às esponjas participam de diversos processos ecológicos, apresentando diferentes papéis. Como simbiote das esponjas, os microrganismos podem: contribuir com o metabolismo de carbono, degradando carboidratos complexos ou gerando produtos da fotossíntese; auxiliar na nutrição através da degradação e biossíntese de compostos ou servindo como alimento ao hospedeiro; reduzir a concentração ou eliminar substâncias prejudiciais; e atuar na defesa do hospedeiro (TAYLOR *et al.*, 2007; SELVIN *et al.*, 2010; PITA *et al.*, 2018). Em nível de ecossistema, os organismos associados participam de ciclos biogeoquímicos, incluindo os ciclos do carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, além de conseguirem influenciar as relações ecológicas, afetando principalmente a predação e a competitividade (KIRAN *et al.*, 2018; PITA *et al.*, 2018)

As esponjas, especialmente os representantes da classe Demospongiae, e seus microrganismos associados, principalmente os membros dos filos Actinobacteria e Proteobacteria, são uma fonte rica de compostos biologicamente ativos (BIBI *et al.*, 2017). Eles produzem metabólitos secundários de várias classes, como peptídeos, policetídeos, terpenos, alcaloides, pigmentos, esteróis e ácidos graxos, que apresentam propriedades relevantes, como antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica (BRAMHACHARI *et al.*, 2016; BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; BIBI *et al.*, 2017). Vários desses compostos derivados de simbiontes de esponjas possuem o potencial de resultar em um futuro fármaco. Por exemplo, uma espécie de *Pseudomonas*, associada a uma esponja do gênero *Homophymia*, produz quinolonas que apresentam atividade contra o *Plasmodium*, agente etiológico da malária, e algumas bactérias e uma cianobactéria, proveniente de uma *Leucetta microraphis*, está envolvida na produção de leucamida A, um composto que inibe o crescimento de células tumorais (BRAMHACHARI *et al.*, 2016).

Além disso, por estar em contato constante com a água e matéria orgânica, o holobionte de esponja é uma fonte rica de enzimas hidrolíticas, que possibilitam a conversão desse material em nutrientes. Muitos desses biocatalizadores, incluindo amilases, proteases, celulases, lipases e esterases, são aplicadas na indústria têxtil, farmacêutica e alimentícia (SANTOS-GANDELMAN *et al.*, 2014). Por exemplo, um *Micrococcus* sp., simbiote de uma esponja do gênero *Spirastella*, consegue produzir uma uretanase que pode ser empregada na remoção do carcinógeno uretano, gerado no processo de fabricação de bebidas alcoólicas (MOHAPATRA e BAPUJI, 1997). Cabe ressaltar que algumas enzimas derivadas de esponjas e seus simbiontes apresentam propriedades únicas como tolerância térmica, ácida, alcalina e a grandes concentrações de sais. A bactéria *Arthrobacter ilicis*, isolada da esponja *Spirastrella* sp., por exemplo, apresenta uma acetilcolinesterase resistente às altas temperaturas (WANG, 2006; SANTOS-GANDELMAN *et al.*, 2014).

Outra aplicação desses tipos de microrganismos está relacionada à biorremediação, ou seja, na capacidade que alguns organismos têm de transformar substâncias tóxicas em formas menos destrutivas (ABATENH *et al.*, 2017). Algumas bactérias provenientes do microbioma de esponjas são capazes de produzir biossurfactantes, compostos anfífilos que podem ser usados na descontaminação de óleos e metais pesados (ARAÚJO *et al.*, 2017). Devido às alterações na microbiota provocada pela presença de contaminantes, os organismos associados também podem ser usados como bioindicadores de poluição. Por exemplo, a identificação de genes de resistência a um metal pesado poderia denunciar a presença deste poluente no

ambiente (SELVIN *et al.*, 2009; SANTOS-GANDELMAN *et al.*, 2014). Há ainda a geração de biofilme, capaz de adsorver contaminantes, podendo ser aplicado no tratamento de águas contaminadas (SANTOS-GANDELMAN *et al.*, 2014).

Uma forma de explorar biotecnologicamente os simbioses de esponjas consiste no seu isolamento e cultivo. No momento atual, ainda há bastante dificuldade no isolamento de microrganismos associado às esponjas. A maioria deles é resistente às técnicas tradicionais de cultivo e não cresce bem *in vitro*, apresentando baixa viabilidade (PALLELA e KIM, 2011). Ademais, nem todos os filos descobertos por métodos moleculares prosperaram em laboratório e o perfil de bactérias cultiváveis nem sempre reflete a abundância de microrganismos presentes (SCHIPPERS *et al.*, 2012). Já foram testados vários métodos para melhorar o cultivo de organismos associados, mas eles normalmente favoreceram o isolamento de seres oportunistas ao invés dos específicos de esponjas (SCHIPPERS *et al.*, 2012). Além disso, a produção de metabólitos secundários pode ser realizada através da construção de biorreatores contendo células de esponjas junto aos organismos associados. Porém, é uma técnica que trouxe pouco sucesso, sendo difícil manter e cultivar células capazes de sintetizar o produto desejado (PALLELA e KIM, 2011). Outra abordagem refere-se à transferência de reações e vias envolvidas na síntese de um produto de interesse para um organismo hospedeiro, tornando capaz de gerar um determinado composto em quantidades suficientes. Essa abordagem permitiu o isolamento de substâncias derivadas de microrganismos não cultiváveis e na obtenção eficaz de moléculas de interesse, como policetídeos e peptídeos não ribossômicos (PALLELA e KIM, 2011).

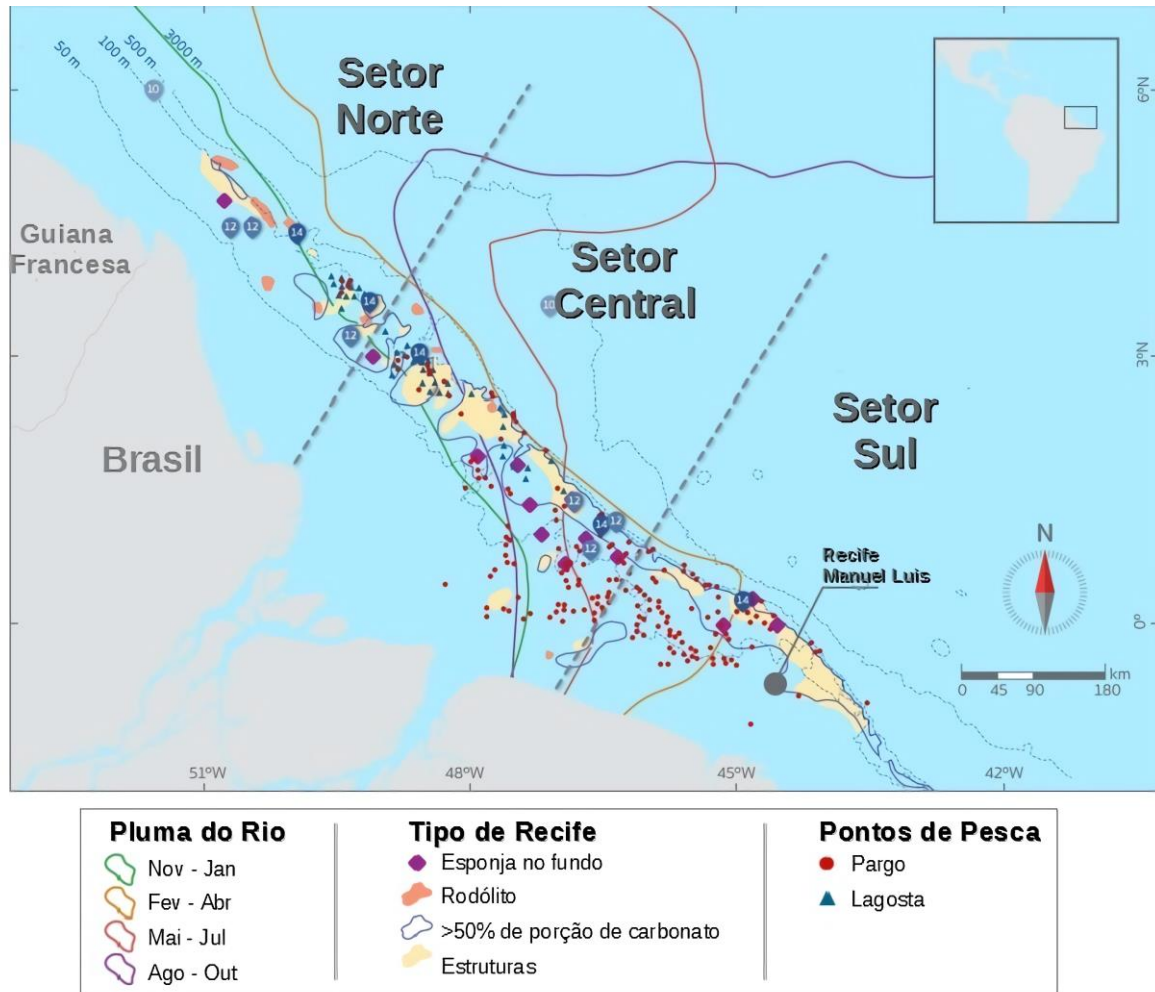
Embora haja um potencial enorme no holobionte da esponja, poucos compostos derivados desses animais seguiram para a fase clínica ou foram aprovados para uso, devido às dificuldades de produção em larga escala (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; TAYLOR *et al.*, 2007). Tais problemas podem ser decorrentes da incapacidade produtiva dos isolados ou da redução na produção com o passar do tempo, provocada pela ausência de pressão seletiva (SELVIN *et al.*, 2010).

### 1.3. RECIFE AMAZONAS

O Recife Amazonas é um extenso recife biogênico situado próximo à foz do Rio Amazonas, entre a fronteira do Brasil com a Guiana Francesa e o estado do Maranhão (latitude: 5° N a 1° S; longitude: 44° O a 51° O), como mostrado na **Figura 4** (MOURA *et al.*, 2016).



Embora sua ocorrência tenha sido inicialmente hipotetizada por Collette e Ruetzler em 1977, a existência do recife só foi confirmada quatro décadas depois na publicação de Moura e colaboradores (2016). O local possui uma área estimada superior a 9.500 km<sup>2</sup> (cobrindo uma área potencial de 56.000 km<sup>2</sup>), chegando a até 220 m de profundidade (FRANCINI-FILHO *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Mapa do Recife Amazonas mostrando sua área, as mudanças sazonais na extensão da pluma e pontos de interesse como locais de pesca e recifes. Retirado e adaptado de Moura *et al.* (2016).

O Recife Amazonas apresenta múltiplos habitats que abrigam uma diversidade de seres vivos, incluindo algas, esponjas, corais, crustáceos e peixes (MOURA *et al.*, 2016; FRANCINI-FILHO *et al.*, 2018). A região sofre grande influência do Rio Amazonas, havendo uma enorme vazão de água e sedimentos suspensos do rio para o recife, o que afeta as propriedades físico-químicas do local, como pH, salinidade, nutrientes dissolvidos e iluminação (MAHIQUES *et al.*, 2019). Outra característica marcante é a presença de uma pluma de sedimentos que varia sazonalmente e impacta muitos aspectos do local. Por exemplo, a pluma, junto à Corrente Norte

do Brasil, influência na atenuação da luz e na sua disponibilidade no fundo. Porém, mesmo com a alta turbidez, organismos fotossintéticos ainda conseguem prosperar no local, em quantidade reduzida (MOURA *et al.*, 2016; FRANCINI-FILHO *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2022). Há também diferenças em parâmetros como nitrogênio orgânico dissolvido e matéria orgânica dissolvida e particulada em regiões com e sem a lama (MOURA *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que, nas camadas com luz reduzida, há um predomínio de genes transcritos relacionados ao metabolismo quimiossintético e heterotrófico (MOURA *et al.*, 2016). Ademais, em análises feitas em microrganismos associados a esponjas do Recife Amazonas, foi constatada a presença de vias relacionadas à ciclagem de elementos como carbono, enxofre e nitrogênio, mostrando a possível participação desses seres em processos ecológicos (PINTO *et al.*, 2022).

O Recife Amazonas também possui grande importância ecológica e econômica. O local alberga espécies ameaçadas de extinção e comercialmente relevantes. Ele ainda abriga uma fonte de petróleo e gás natural. Por causa disso, partes da região foram vendidas a empresas, já havendo projetos em andamento para sua exploração. Tais projetos são uma ameaça ao recife e podem gerar sérios impactos ambientais na localidade (MOURA *et al.*, 2016; MAHIQUES *et al.*, 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

Mesmo com a escassez de produtos derivados de esponjas no mercado e as dificuldades de produção, as esponjas e seus microrganismos associados ainda são uma fonte relevante de enzimas e outros metabólitos secundários (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; BIBI *et al.*, 2017). Contudo, não é incomum encontrar produtos naturais derivados de esponjas ou dos simbioses sendo comercializados. Como exemplo de tais produtos, existem as moléculas geodiamolida H, polidiscamida A e manzamina A que apresentam propriedades anticâncer, antimicrobiana e antiprotozoário, respectivamente (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; BIBI *et al.*, 2017; AKBARIAN *et al.*, 2022). A metagenômica é uma importante ferramenta utilizada para descobrir enzimas e compostos, principalmente para microrganismos associados às esponjas que normalmente são difíceis de serem isolados e raramente crescem *in vitro* (SCHIPPERS *et al.*, 2012; BERINI *et al.*, 2017). Alguns projetos anteriores já mostram o uso do metagenoma do tecido de esponjas para esse fim, como visto na descoberta de novos policetídeos (NAKASHIMA *et al.*, 2016; STOREY *et al.*, 2020). Dessa maneira, é possível descobrir novos microrganismos e compostos que possam ser úteis do ponto de vista biotecnológico.

Cabe ressaltar que estudar os microrganismos associados pode ajudar a inferir como a esponja consegue prosperar no seu habitat e como esses organismos influenciam o ecossistema. O Recife Amazonas é um sistema com características peculiares, sendo muito afetado pela presença da pluma de sedimentos, um fator limitante da luz, e pela vazão do Rio Amazonas. Tais características não afetam apenas parâmetros físico-químicos (e.g. disponibilidade de nutrientes e luminosidade), mas também geram impactos nos organismos do local (MOURA *et al.*, 2016; MAHIQUES *et al.*, 2019). Além disso, outras publicações já trataram do possível papel ecológico dos simbioses no sucesso do hospedeiro, seja ele uma esponja ou outro animal, e das suas contribuições ao ecossistema (HANDELSMAN, 2004; STOREY *et al.*, 2020; NAKASHIMA *et al.*, 2016). Assim, a análise desses microrganismos pode gerar evidências acerca da contribuição deles tanto para o hospedeiro, como para o Recife Amazonas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Descrever e evidenciar o potencial e a importância, do ponto de vista metabólico, ecológico e biotecnológico, de 10 bactérias não cultivadas associadas a esponjas provenientes do Recife Amazonas, pertencentes ao filo candidato Latescibacterota, cujas características não são completamente conhecidas, por meio da análise de MAGs com métodos de bioinformática.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

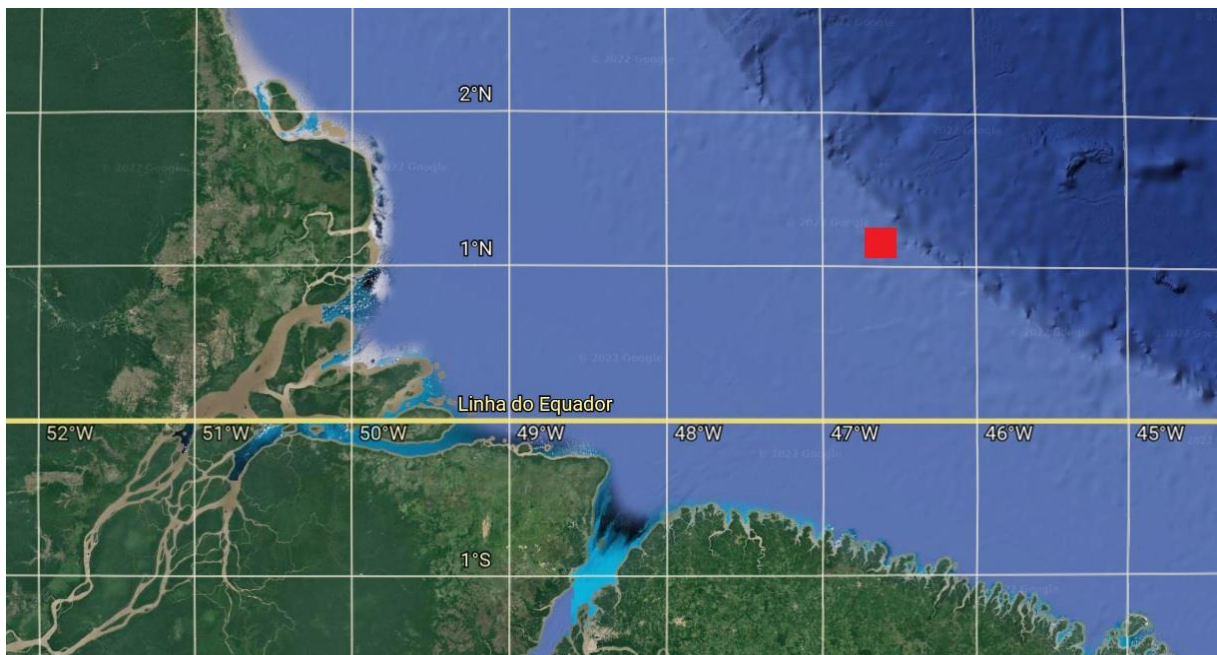
- Descrever os principais aspectos do metabolismo das 10 bactérias não cultivadas associadas a esponjas do Recife Amazonas, pertencentes ao filo candidato Latescibacterota;
- Inferir a função ecológica desses microrganismos no microbioma da esponja e no Recife Amazonas;
- Verificar uma possível aplicabilidade biotecnológica desses microrganismos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO DO DNA METAGENÔMICO

#### 4.1.1. Coleta de amostras

As amostras de esponjas foram obtidas próximas à foz do Rio Amazonas (lat. 1.299817; long. -46.778867) no dia 27 de setembro de 2014 (**Figura 5**). Foram coletadas amostras de esponjas dos gêneros *Agelas* e *Geodia*, entre elas as espécies: *Agelas dispar*, *Agelas clathrodes*, *Agelas clathrodes*, *Geodia sp.*, *Geodia cf. corticostylifera* e *Geodia neptuni*. O material coletado foi transportado em recipientes contendo 20 L de água do mar sob 24 °C de temperatura, aproximadamente.



**Figura 5.** Região onde as amostras foram coletadas. O quadrado vermelho indica o ponto aproximado da coleta. Retirado e adaptado do Google Earth.

#### 4.1.2. Extração do DNA

Ao chegar no laboratório da UFRJ, as amostras foram transferidas para recipientes com água do mar esterilizada, permanecendo em descanso por 5 a 10 minutos, com o intuito de remover microrganismos provenientes da água. O tecido de cada esponja foi secado e dissecado com bisturi, removendo organismos macroscópicos associados. Cerca de 1 g do tecido foi

congelado com nitrogênio líquido e posteriormente pulverizado. O DNA foi extraído e purificado com solução de 4 M de hidrocloreto de guanidina, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,05 M de EDTA, 0,5% de lauroil sarcosinato de sódio, e 1% de b-mercaptoetanol. Depois, foi feita uma etapa de extração com fenol/clorofórmio, seguida por precipitação com etanol e ressuspensão em 50  $\mu$ L de água ultrapura, como descrito por Trindade-Silva *et al.* (2012).

## 4.2. RECUPERAÇÃO DE MAGS

### 4.2.1. Sequenciamento e montagem

A biblioteca de DNA foi construída com o kit de preparo TruSeq Nano DNA da Illumina. O sequenciamento foi realizado com o sistema Novaseq da Illumina, gerando *paired-end reads* de 150 bp e cobertura de 20 GB para cada amostra. O processamento de *reads* foi feito com os programas Sickle v1.33 (disponível em <https://github.com/najoshi/sickle>), que retira a porção final 3' e 5' das sequências, e BBtools v35 (disponível em <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>), que remove sequências phiX e os adaptadores Illumina. As *reads* do metagenoma de cada esponja foram montadas com metaSPAdes v3.1.3 (NURK *et al.*, 2017), com eliminação de *scaffolds* menores de 1 Kb.

### 4.2.2. Recuperação dos MAGs

Os MAGs foram recuperados usando o programa MaxBin2 v2.2.14, com 40 e 107 marcadores (WU; SIMMONS; SINGER, 2016). Os MAGs foram agregados por meio da ferramenta DASTool v1.1.2 (SIEBER *et al.*, 2018) e posteriormente selecionados, com base na quantidade de GC, cobertura e taxonomia, pelo programa uBin v.0.9.14 (BORNEMANN *et al.*, 2020). Em seguida, foi feita a desreplicação, ou seja, a remoção de genomas muito similares, com dRep v3.2.2 (OLM *et al.*, 2017). No final, foram recuperados 1.054 MAGs do microbioma das esponjas. Para ajudar a definir a qualidade deles, foram calculadas a contaminação com CheckM v1.0.13 (PARKS *et al.*, 2015) e a cobertura com o CoverM v0.6.1 (disponível em <https://github.com/wwood/CoverM>). Os genomas montados com completude menor que 70% e contaminação maior que 10% foram descartados, sobrando 205 MAGs.

Os MAGs não eliminados foram anotados com o Prokka v1.14.5 (SEEMANN, 2014) e classificados taxonomicamente com referência à base de dados SILVA de rRNA 16S, que

contém sequências da subunidade menor (SSU) do rRNA (QUAST *et al.*, 2013). MAGs com resultado inconclusivo na classificação por rRNA 16S foram posteriormente classificados através de árvores filogenéticas de genes marcadores, como de rRNA e subunidades da RNA polimerase.

Dentre os MAGs recuperados, foram selecionados 10, com base na classificação taxonômica, para serem analisados mais detalhadamente. Foram escolhidos esses MAGs devido à classificação taxonômica com o gene 16S rRNA ter sido inconclusiva e eles pertencerem a um mesmo grupo em classificações preliminares, um grupo pouco descrito na literatura científica. Os identificadores utilizados para distinguir cada MAG estão listados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Lista com os identificadores utilizados para distinguir os MAGs.

<b>MAGs</b>	
1.	FT14_Bacteria2_151_60
2.	FT14_metaspades3.13_max40.044
3.	FT16_curated_Bacteria_39_61
4.	FT39_curated_Bacteria_12_62
5.	FT39_curated_Bacteria_21_61
6.	FT39_curated_Bacteria_27_60
7.	FT41_curated_Bacteria_80_57
8.	FT41_curated_Bacteria2_97_61
9.	FT48_curated_Bacteria_57_60
10.	FT48_curated_Bacteria_77_51

### 4.3. DESCRIÇÃO DOS MAGS

#### 4.3.1. Métricas dos genomas e qualidade dos MAGs

As métricas do genoma, parâmetros que ajudam a caracterizar o genoma e definir a qualidade de uma montagem, foram obtidas por meio dos programas GenomeQC, Prokka, CoverM e CheckM. O GenomeQC fornece dados sobre: número de *scaffolds* e o tamanho do maior e menor *scaffold*; quantidade total de pares de base; N50, L50, NG50 e LG50; e porcentagem de GC (MANCHANDA *et al.*, 2020). Foi utilizada a função “*Analyze your genome assembly*” do servidor do programa (disponível em <https://genomeqc.maizegdb.org>) na configuração padrão. O Prokka, além de realizar a anotação, fornece informações acerca da

quantidade de genes, tRNA, rRNA, tmRNA e regiões de repetição (SEEMAN, 2014). Por fim, foram usados os dados sobre contaminação e completude obtidos anteriormente com o CheckM e CoverM. Algumas dessas métricas, entre elas a completude, contaminação, presença de certas moléculas de rRNA (5S, 16S e 23S) e a quantidade de tRNAs, foram usadas para determinar a qualidade dos genomas montados com base em parâmetros definidos por Bowers *et al.* (2017).

#### 4.3.2. Classificação taxonômica

A classificação foi realizada com base em genes conservados, por meio da ferramenta GTDB-Tk v1.6.0 (CHAUMEIL *et al.*, 2020), presente no servidor KBase (disponível em <https://www.kbase.us>) (ARKIN *et al.*, 2018). Esse programa identifica e extrai genes marcadores específicos de determinado domínio taxonômico, realiza o alinhamento e insere os dados em árvores de referência. A classificação teve como referência a base de dados GTDB v202 (PARKS *et al.*, 2020).

A partir dos resultados do GTDB-Tk, foi produzida uma árvore filogenética baseada em códons com os MAGs em estudo, outros representantes do filo no qual eles foram classificados (Latescibacterota) e representantes de um filo próximo (Gemmatimonadetes), além de um *outgroup*, formado por membros do filo Firmicutes. A árvore foi gerada com recursos do servidor Patric v3.6.12 (DAVIS *et al.*, 2020), utilizando as funções: “*Similar Genome Finder*”, que, por meio do programa Mash (ONDOV *et al.*, 2016), mostra genomas similares a um genoma de referência ao estimar a distância entre eles com MinHash; e “*Phylogenetic Tree*”, que identifica grupos homólogos de genes de cópia única (sequências de DNA e aminoácidos) e realiza o alinhamento das sequências, seguido pela concatenação dos alinhamentos. A árvore foi construída por estimativa de máxima verossimilhança com o programa RAxML (STAMATAKIS *et al.*, 2014) e foi visualizada com o FigTree v1.4.4 (disponível em <https://github.com/rambaut/figtree>), sendo feitas alterações estéticas para melhor visualização.

Além disso, foram utilizadas as ferramentas ANI (*average nucleotide index*) e dDDH (*digital DNA-DNA hybridization*) para comparar os 10 MAGs, determinando a distância entre eles. O ANI foi realizado no servidor do JSpeciesWS v3.9.1 (disponível em <http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) (RICHTER *et al.*, 2016), enquanto o dDDH foi feito com o programa GGDC v3.0 (disponível em <https://ggdc.dsmz.de>) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013). Nos dois programas, foi usada a configuração padrão e a ferramenta de alinhamento escolhida foi o BLAST. No caso do GGDC, o cálculo é realizado em três fórmulas distintas,



optando-se pela fórmula recomendada, que calcula a distância com base na identidade e tamanho do par de maior valor.

### 4.3.3. Proteínas similares às eucarióticas

A procura por proteínas similares às eucarióticas, componente importante para o estabelecimento da simbiose, foi conduzida usando dois programas na configuração padrão: Pannzer2 e CD-Search. O Pannzer2 (disponível em <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/sanspanz/>) faz a busca na base de dados Uniprot (TÖRÖNEN; MEDLAR; HOLM, 2018). Por outro lado, o CD-Search (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) procura na base de dados própria de domínios conservados (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004). Nos arquivos com os resultados, foi feita a busca manual das proteínas pelo nome do domínio, no caso do CD-Search, ou pela descrição, no caso do Pannzer2.

### 4.4. RECONSTRUÇÃO METABÓLICA

A reconstrução metabólica foi feita através da verificação da presença de enzimas envolvidas em reações presentes em determinadas vias metabólicas. As principais fontes de informações foram as bases de dados de vias metabólicas KEGG v97.0 (KANEHISA *et al.*, 2017) e MetaCyc v26.0 (CASPI *et al.*, 2020).

No caso do KEGG, foi primeiramente feita a reanotação dos MAGs no BlastKOALA v2.2 (disponível em <https://www.genome.jp/kegg/>) (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016). O parâmetro referente à taxonomia foi alterado para “*Bacteria*” e a base de dados escolhida para a busca foi a “*family\_eukaryotes + genus\_prokaryotes*”. Ao finalizar, o servidor gerou um arquivo de texto contendo a correlação dos genes anotados com o código identificador de KO (KEGG Orthology). Esse arquivo foi posteriormente inserido na ferramenta “*Reconstruct Pathway*” do KEGG Mapper (KANEHISA e SATO, 2019). O resultado final foi a demonstração gráfica, produzida pelo programa, das reações realizadas em cada via metabólica presente na base de dados analisada. Os dados sobre as vias presentes, além das principais reações e enzimas, foram registrados e separados em arquivos distintos com base na função metabólica. Em adição às informações acerca das vias, foram registrados os dados sobre

famílias de proteínas, incluindo enzimas, transportadores, toxinas, sistemas de defesa, sistema de excreção e resistência a antimicrobianos.

Para a verificação no MetaCyc, foi utilizado o software Pathway Tools v23.0 (KARP *et al.*, 2021). Ao inserir o arquivo com o genoma no programa, ele é processado gerando listas e tabelas referentes às vias, enzimas, polipeptídeos, transportadores, compostos e tRNAs presentes no genoma, separadas de acordo com a função metabólica. Apenas os dados de interesse sobre as vias, enzimas e transportadores foram registrados. Gráficos foram gerados no programa Writer e Calc do LibreOffice e mapas de calor foram produzidos com o pacote “pheatmap” do R.

## 4.5. BUSCA POR COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

### 4.5.1. Enzimas de interesse biotecnológico

A procura por enzimas de interesse biotecnológico foi realizada pela busca do nome da enzima, e de alguns sinônimos, no genoma previamente anotado. Essa busca também foi feita no genoma reanotado pelo BlastKOALA. As enzimas procuradas compõem a **Tabela 2**, construída tendo como referencial a literatura científica, com auxílio do banco de dados de enzimas BRENDA (JESKE *et al.*, 2019). Foram selecionadas enzimas que tenham alguma importância biotecnológica descrita em artigos.

Ainda foi feita a identificação de CAZymes, enzimas que catalisam reações de degradação, biossíntese ou modificação de carboidratos. Para isso, foi utilizada a base de dados especializada CAZy (DRULA *et al.*, 2022), além do servidor dbCAN2 (disponível em <https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) (ZHANG *et al.*, 2018a). Esse servidor permite procurar por essas enzimas, usando três ferramentas distintas: Hmmer, DIAMOND e eCAMI. No final, foi gerado um arquivo de texto indicando a presença de enzimas similares e suas classes, além de outras informações como identidade, cobertura, *e-value* e região do gene. Foram considerados apenas os genes identificados pelos três métodos.

**Tabela 2.** Lista com o nome e o número EC de todas as enzimas procuradas nos genomas analisados.

Nome	Número EC	Nome	Número EC
Alcool desidrogenase	EC 1.1.1.1	Beta-glicosidase	EC 3.2.1.21
Glicerol desidrogenase	EC 1.1.1.6	Alfa-galactosidase	EC 3.2.1.22
Glicose oxidase	EC 1.1.3.4	Beta-galactosidase	EC 3.2.1.23
Bilirrubina oxidase	EC 1.1.3.5	Beta-fructofuranosidase	EC 3.2.1.26
Colesterol oxidase	EC 1.1.3.6	Hialuronidase	EC 3.2.1.35
D-aminoácido oxidase	EC 1.4.3.3	Beta-xilosidase	EC 3.2.1.37
Lacase	EC 1.10.3.2	Alfa-ramnosidase	EC 3.2.1.40
Peroxidase	EC 1.11.1.-	Pullulanase	EC 3.2.1.41
Catalase	EC 1.11.1.6	Alfa-L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55
Hidrogenase	EC 1.12.-.-	Licheninase	EC 3.2.1.73
Lipoxigenase	EC 1.13.11.-	Beta-manosidase	EC 3.2.1.78
Dioxigenase	EC 1.14.11.-	Lactase	EC 3.2.1.108
Monoxigenase	EC 1.14.13.-	Quitosanase	EC 3.2.1.132
Tirosinase	EC 1.14.18.1	Epóxido hidrolase	EC 3.3.2.9
Superóxido dismutase	EC 1.15.1.	Amino peptidase	EC 3.4.11.-
Nitrogenase	EC 1.18.6.1	Serina peptidase	EC 3.4.21.-
Dextranucrase	EC 2.4.1.5	Cisteína protease	EC 3.4.22.-
Levansucrase	EC 2.4.1.10	Renina	EC 3.4.23.15
Enzima ramificadora de glicogênio	EC 2.4.1.18	Colagenase	EC 3.4.24.7
Ciclomaltodextrina glucanotransferase	EC 2.4.1.19	Termolisina	EC 3.4.24.27
Rodanase	EC 2.8.1.1	Serralisina	EC 3.4.24.40
CRISPR-Cas9	EC 3.1.-.-	Amidase	EC 3.5.1.-
Esterase	EC 3.1.1.-	Asparaginase	EC 3.5.1.1
Lipase	EC 3.1.1.3	Glutaminase	EC 3.5.1.2
Tanase	EC 3.1.1.20	Urease	EC 3.5.1.5
Fosfolipase	EC 3.1.1.32	Beta-lactamase	EC 3.5.2.6
Cutinase	EC 3.1.1.74	Nitrilase	EC 3.5.5.1
Fosfatase alcalina	EC 3.1.3.1	Dealogenase	EC 3.8.1.-
Fitase	EC 3.1.3.8	Rubisco	EC 4.1.1.39
Amilase	EC 3.2.1.-	Nitrila hidratase	EC 4.2.1.84
Endoglucanase	EC 3.2.1.-	Alginate-liase	EC 4.2.2.-
Maltoidrolase	EC 3.2.1.-	Celobiose epimerase	EC 5.1.3.11
Pectinase	EC 3.2.1.-	L-arabinose isomerase	EC 5.3.1.4
Xilanase	EC 3.2.1.8	Xilose isomerase	EC 5.3.1.5
Quitinase	EC 3.2.1.14	L-ramnose isomerase	EC 5.3.1.14
Lisozima	EC 3.2.1.17	Isomaltulose sintase	EC 5.4.99.11
Alfa-glicosidase	EC 3.2.1.20		

#### 4.5.2. Metabólitos secundários

A busca por *clusters* de genes ligados à produção de metabólitos secundários foi feita através do servidor do antiSMASH v6.0 (disponível em <https://antiSMASH.secondarymetabolites.org>) (BLIN *et al.*, 2021). O programa foi executado na configuração padrão, com a rigidez de detecção relaxada. Após a execução, foram gerados diversos arquivos que mostram os *clusters* identificados e as regiões onde foram encontrados.

### 4.5.3. Peptídeos biologicamente ativos

A procura por peptídeos biologicamente ativos (BAP) começou com a extração dos peptídeos presentes nos MAGs. O tamanho de cada sequência presente foi determinado usando o programa FASTA Length v1.0 (disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Spouge/html\\_ncbi/html/fasta/length.html](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Spouge/html_ncbi/html/fasta/length.html)). Por conta da limitação de programas que serão utilizados posteriormente, foram considerados como peptídeos apenas as sequências com menos de 100 aminoácidos. As sequências de peptídeos foram extraídas com o programa FASTA sequence extractor, umas das ferramentas do FaBox v1.61 (disponível em [https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/fasta\\_extractor.php](https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/fasta_extractor.php)) (VILLESEN, 2007). A única alteração na configuração padrão do programa foi a ativação da correspondência parcial dos identificadores. No final, foi gerado um arquivo só com as sequências de aminoácidos dos peptídeos de cada MAG.

Em seguida, as sequências foram inseridas no servidor PeptideRanker (disponível em <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) (MOONEY *et al.*, 2012), programa que indica a probabilidade do peptídeo ser biologicamente ativo. Os peptídeos com chance acima de 0,5 foram selecionados para tentar prever a sua função biológica.

**Tabela 3.** Programas utilizado para prever a função de peptídeos biologicamente ativos.

Programa	Função predita	Disponível em	Referência
AntiCP	Atividade Anticâncer	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2/predict.php">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2/predict.php</a>	(AGRAWAL <i>et al.</i> , 2021)
Antifp	Atividade Antifúngica	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antifp/">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antifp/</a>	(AGRAWAL <i>et al.</i> , 2018)
AntiAngioPred	Atividade Anti-inflamatória	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antiangiopred/">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antiangiopred/</a>	(RAMAPRASAD <i>et al.</i> , 2015)
AntiBP2	Atividade Antimicrobiana	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antibp2/submit.html">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antibp2/submit.html</a>	(LATA; MISHRA; RAGHAVA, 2010)
CAMP3	Atividade Antimicrobiana	<a href="http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/">http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/</a>	(WAGHU <i>et al.</i> , 2016)
Toxinpred	Toxina	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html</a>	(GUPTA <i>et al.</i> , 2013)

Para a predição funcional, foram utilizados diversos programas que identificam diferentes funções. Dados sobre os programas utilizados e a função a ser predita estão presentes na **Tabela 3**. No geral, foi utilizada a configuração padrão com o *cut-off* de 0,5 para todos os programas. Nos programas que possuem mais de uma base de dados de referência, método ou algoritmo de análise, a predição foi realizada em todos as bases e modelos disponíveis. Por fim, as informações obtidas a partir desses programas foram reunidas em uma planilha contendo o identificador do peptídeo e a probabilidade calculada pelos programas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DESCRIÇÃO DOS MAGS

#### 5.1.1. Métricas dos genomas e qualidade dos MAGs

A **Tabela 4** mostra nove parâmetros (quantidade de *scaffolds*, tamanho do genoma montando, tamanho do maior e menor *scaffold*, N50, NG50, L50, LG50 e quantidade de GC) obtidos com o programa GenomeQC. Na **Tabela 5**, aparecem os demais parâmetros: completude, obtida com CoverM; contaminação, obtida com o CheckM; além da quantidade de genes, CDS, rRNA, tRNA, tmRNA e regiões com repetição, adquiridos através do Prokka.

**Tabela 4.** Métricas dos MAGs obtidas através do programa GenomeQC.

MAG	Scaffolds	Tamanho [bp]	> Scaffold [bp]	< Scaffold [bp]	N50 [bp]	L50	NG50 [bp]	LG50	GC [%]
FT14_Bacteria2_151_60	76	5462990	356540	1118	137738	13	148784	12	60,05
FT14_metaspades3.13_max40.044	214	4933867	125691	1024	51157	31	49703	32	55,86
FT16_curated_Bacteria_39_61	122	5488755	235622	1006	126379	17	129535	15	60,61
FT39_curated_Bacteria_12_62	254	2593951	81533	1025	15999	43	14152	57	61,97
FT39_curated_Bacteria_21_61	497	3225546	39626	1006	10863	83	11963	73	60,95
FT39_curated_Bacteria_27_60	507	3336574	105468	1001	12411	71	14273	58	60,11
FT41_curated_Bacteria_80_57	1027	3416376	31160	1001	3999	262	4488	212	57,23
FT41_curated_Bacteria2_97_61	430	4488921	91467	1005	18027	77	20025	64	61,13
FT48_curated_Bacteria_57_60	69	4490256	524568	1023	212125	8	213122	7	59,94
FT48_curated_Bacteria_77_51	20	3391615	566399	1011	308406	5	315559	4	50,95

**Tabela 5.** Métricas dos MAGs obtidas com os programas CheckM, CoverM e Prokka.

MAG	Completeness [%]	Contaminação [%]	Genes	CDS	rRNA	tRNA	tmRNA	Repetições
FT14_Bacteria2_151_60	97,74	3,3	4619	4545	17	56	1	4
FT14_metaspades3.13_max40.044	96,7	0,36	4095	4042	3	49	1	2
FT16_curated_Bacteria_39_61	96,64	1,3	4649	4566	19	63	1	3
FT39_curated_Bacteria_12_62	86,2	0	2210	2172	2	35	1	0
FT39_curated_Bacteria_21_61	84,85	1,4	2622	2589	0	32	1	1
FT39_curated_Bacteria_27_60	73,86	4,4	2801	2756	0	45	0	0
FT41_curated_Bacteria_80_57	89,56	1,4	2870	2826	0	44	0	0
FT41_curated_Bacteria2_97_61	97,74	6,59	3724	3648	17	58	1	0
FT48_curated_Bacteria_57_60	84,45	4,4	3689	3639	3	46	1	2
FT48_curated_Bacteria_77_51	71,43	0,3	3036	3002	3	30	1	1

De acordo com padrões definidos por Bowers *et al.* (2017), um *draft* de alta de qualidade possui os rRNAs 5S, 16S e 23S, ao menos 18 tRNAs, além de completude maior que 90% e contaminação menor que 5%. *Drafts* de qualidade média precisam ter apenas completude maior ou igual a 50% e contaminação menor que 10%. Por fim, *drafts* de baixa qualidade apresentam completude menor que 50% e contaminação menor que 10%. Assim, apenas três dos MAGs analisados possuem qualidade alta (**Tabela 6**). Os outros apresentam qualidade média seja por causa da contaminação acima de 5%, seja pela completude ser menor que 90% ou devido à ausência de determinados rRNAs.

**Tabela 6.** Qualidade dos MAGs determinadas com base em Bowers et al. (2017).

MAG	rRNA 5S	rRNA 16S	rRNA 23S	tRNA	Completude [%]	Contaminação [%]	Qualidade
FT14_Bacteria2_151_60	Presente	Presente	Presente	56	97,74	3,3	Alta
FT14_metaspades3.13_max40.044	Presente	Presente	Presente	49	96,7	0,36	Alta
FT16_curated_Bacteria_39_61	Presente	Presente	Presente	63	96,64	1,3	Alta
FT39_curated_Bacteria_12_62	Presente	Presente	Ausente	35	86,2	0	Média
FT39_curated_Bacteria_21_61	Ausente	Ausente	Ausente	32	84,85	1,4	Média
FT39_curated_Bacteria_27_60	Ausente	Ausente	Ausente	45	73,86	4,4	Média
FT41_curated_Bacteria_80_57	Ausente	Ausente	Ausente	44	89,56	1,4	Média
FT41_curated_Bacteria2_97_61	Presente	Presente	Presente	58	97,74	6,59	Média
FT48_curated_Bacteria_57_60	Presente	Presente	Presente	46	84,45	4,4	Média
FT48_curated_Bacteria_77_51	Presente	Presente	Presente	30	71,43	0,3	Média

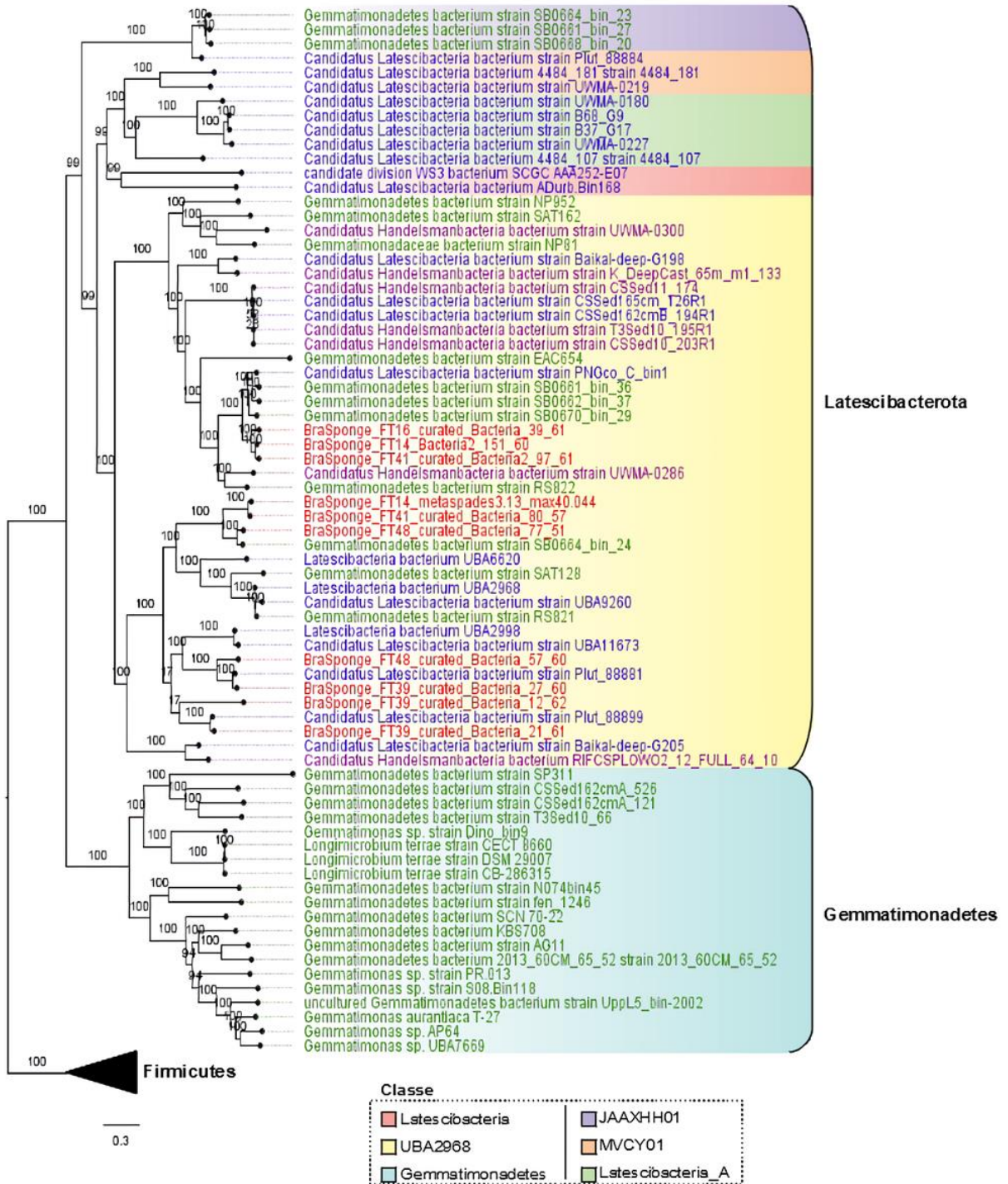
Parâmetros em fundo verde apresentaram alta qualidade. As demais cores mostram parâmetros que estiveram abaixo no nível de qualidade alta, levando à redução da qualidade do MAG.

### 5.1.2. Classificação taxonômica

De acordo com a classificação feita no GTDB-tk, todos os MAGs compartilham a mesma classificação taxonômica até a classe (domínio Bacteria; filo candidato Latescibacterota; classe UBA2968), como mostrado na **Tabela 7**. A árvore filogenética construída mostra a relação dos MAGs com outros indivíduos do filo Latescibacterota e de filis próximos (**Figura 6**).

**Tabela 7.** Classificação taxonômica realizada pelo programa GTDB-tk.

MAG	Classificação
FT14_Bacteria2_151_60	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA8231;f_UBA8231;g_GCA-2724215;s_
FT14_metaspades3.13_max40.044	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_UBA2968;g_VXRD01;s_
FT16_curated_Bacteria_39_61	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA8231;f_UBA8231;g_GCA-2724215;s_
FT39_curated_Bacteria_12_62	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_GCA-2709665;g_ ;s_
FT39_curated_Bacteria_21_61	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_GCA-2709665;g_JAAXHW01;s_JAAXHW01 sp012270675
FT39_curated_Bacteria_27_60	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_GCA-2709665;g_JAAXHE01;s_JAAXHE01 sp012271065
FT41_curated_Bacteria_80_57	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_UBA2968;g_VXRD01;s_
FT41_curated_Bacteria2_97_61	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA8231;f_UBA8231;g_GCA-2724215;s_
FT48_curated_Bacteria_57_60	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_GCA-2709665;g_JAAXHE01;s_
FT48_curated_Bacteria_77_51	d_Bacteria;p_Latescibacterota;c_UBA2968;o_UBA2968;f_UBA2968;g_VXRD01;s_



**Figura 6.** Árvore filogenética mostrando a relação entre os MAGs, destacados de vermelho, com outros organismos próximos dos filos Latescibacterota e Gemmatimonadetes, identificados com o nome dado no NCBI. Foram utilizados 59 genes de cópia única. A raiz da árvore está no *outgroup*, formado por genomas do filo Firmicutes. As expressões após os parênteses indicam o filo atribuído enquanto a cor de fundo indica a classe.

Além disso, a similaridade dos genomas foi avaliada através do ANI e do dDDH. Valores de ANI maior ou igual a 95% - 96%, ou de dDDH maior ou igual a 70% indicam que os pares de genomas analisados pertencem à mesma espécie (CHUN *et al.*, 2018). Então, por

apresentarem um ANI de 96,89 e 96,01, os genomas FT14\_Bacteria2\_151\_60 e FT41\_curated\_Bacteria2\_97\_61 podem ser considerados da mesma espécie. O par FT41\_curated\_Bacteria\_80\_57 e FT14\_metaspades3.13\_max40.044 também apresentou valores de ANI acima do ponto de corte (**Tabela 8**). Nesses dois casos, os dados do ANI foram corroborados pelo dDDH, cujo valor para o primeiro par foi 73,6 e de 72,3 para o segundo par (**Tabela 9**).

**Tabela 8.** Resultado da verificação de similaridade entre genomas por meio do ANI, calculado no servidor JSpeciesWS.

**ANiB**

	FT14_Bacteria2_151_60	FT14_metaspades3.13_max40.044	FT16_curated_Bacteria_39_61	FT39_curated_Bacteria_12_62	FT39_curated_Bacteria_21_61	FT39_curated_Bacteria_27_60	FT41_curated_Bacteria_80_57	FT41_curated_Bacteria2_97_61	FT48_curated_Bacteria_57_60	FT48_curated_Bacteria_77_51
FT14_Bacteria2_151_60	*	67,4	90,71	64,72	65,32	64,84	66,73	<b>96,01</b>	66,13	66,32
FT14_metaspades3.13_max40.044	67,56	*	68,23	65,69	67,62	66,33	<b>95,62</b>	66,99	66,83	77,32
FT16_curated_Bacteria_39_61	90,84	68,04	*	64,71	65,41	64,95	67,03	90,97	66,08	66,64
FT39_curated_Bacteria_12_62	64,89	65,54	64,71	*	69,65	67,64	65,84	64,83	67,71	64,8
FT39_curated_Bacteria_21_61	65,47	67,43	65,7	69,66	*	70,04	67,38	65,58	70,48	66,98
FT39_curated_Bacteria_27_60	65,34	66,25	65,4	67,53	70,12	*	66,39	65,37	81,03	66,1
FT41_curated_Bacteria_80_57	66,47	<b>96,44</b>	66,95	65,78	67,43	66,57	*	66,12	66,76	77,88
FT41_curated_Bacteria2_97_61	<b>96,89</b>	67,12	91,69	64,7	65,46	64,88	66,23	*	65,99	66,15
FT48_curated_Bacteria_57_60	65,86	66,75	65,94	67,57	70,36	80,58	66,64	65,79	*	66,65
FT48_curated_Bacteria_77_51	66,07	77,85	66,51	65,23	67,31	65,94	77,74	66,01	66,63	*

Valores acima de 95%, destacados de preto, indicam que os genomas pertencem à mesma espécie.



**Tabela 96.** Resultado da verificação de similaridade entre genomas por meio do dDDH, calculado pelo programa GGDC.

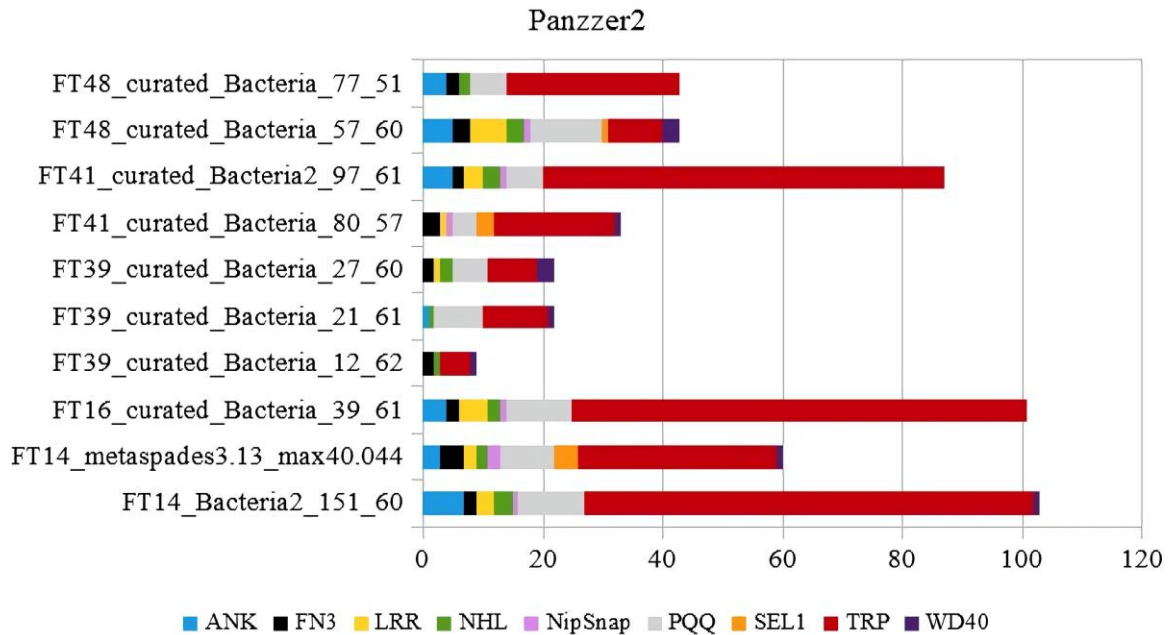
dDDH

	FT14_Bacteria2_151_60	FT14_metaspades3.13_max40.044	FT16_curated_Bacteria_39_61	FT39_curated_Bacteria_12_62	FT39_curated_Bacteria_21_61	FT39_curated_Bacteria_27_60	FT41_curated_Bacteria_80_57	FT41_curated_Bacteria2_97_61	FT48_curated_Bacteria_57_60	FT48_curated_Bacteria_77_51
FT14_Bacteria2_151_60	*	25,5	43,2	21,7	23,2	16,9	24,6	<b>73,6</b>	22,7	21
FT14_metaspades3.13_max40.044	25,5	*	24,8	17,2	21,6	15,3	<b>72,3</b>	27,9	18,2	22,2
FT16_curated_Bacteria_39_61	43,2	24,8	*	22,4	24,8	21,4	28	45,7	19,2	24,7
FT39_curated_Bacteria_12_62	21,7	17,2	22,4	*	18,9	16,6	28,9	29,9	18,1	23,7
FT39_curated_Bacteria_21_61	23,2	21,6	24,8	18,9	*	19,2	19,4	22,4	18,4	28,3
FT39_curated_Bacteria_27_60	16,9	15,3	21,4	16,6	19,2	*	15,7	15,7	24,8	16,4
FT41_curated_Bacteria_80_57	24,6	<b>72,3</b>	28	28,9	19,4	15,7	*	23,6	15,4	22,2
FT41_curated_Bacteria2_97_61	<b>73,6</b>	27,9	45,7	29,9	22,4	15,7	23,6	*	19,7	27,9
FT48_curated_Bacteria_57_60	22,7	18,2	19,2	18,1	18,4	24,8	15,4	19,7	*	21,9
FT48_curated_Bacteria_77_51	21	22,2	24,7	23,7	28,3	16,4	22,2	27,9	21,9	*

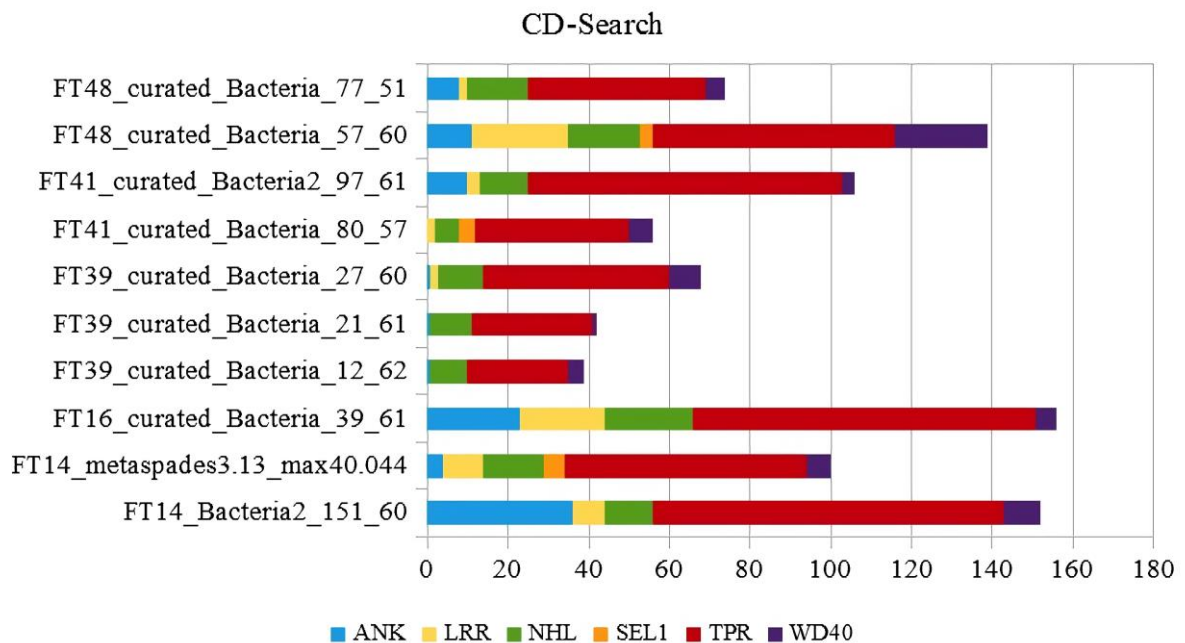
Valores acima de 70%, destacados de preto, indicam que os genomas pertencem à mesma espécie.

### 5.1.3. Proteínas similares às eucarióticas

Tanto o Panzzer2 como o CD-Search conseguiram encontrar várias ELPs nos MAGs. No CD-Search foram identificados os seguintes domínios: repetição de anquirina (ANK); repetição rica em leucina (LRR); repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41 (NHL); repetição similar a SEL1 (SEL1); repetição de tetratricopeptídeo (TPR); e repetição de WD40 (WD40) (**Figura 8**). Por outro lado, o Panzzer2 identificou os mesmos domínios identificados no CD-Search, com a adição dos domínios de Fibronectina tipo-III (FN3), repetição de pirroloquinolina quinona (PQQ), e a família NipSnap (**Figura 7**). Quanto às diferenças nos resultados obtidos pelos dois programas, o Panzzer2 identificou uma variedade maior de domínios, enquanto CD-Search achou uma quantidade maior de domínios nos MAGs. Apesar disso, o domínio mais prevalente, nos dois programas, foi o TPR.



**Figura 7.** Domínios relacionados às proteínas similares às eucarióticos encontrados nos MAGs através do programa Panzer2. ANK = repetição de anquirina; FN3 = fibronectina tipo-III; LRR = repetição rica em leucina; NHL = repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41; SEL1 = repetição similar a SEL1; PQQ = repetição de pirroloquinolina quinona; TPR = repetição de tetratricopeptídeo; WD40 = repetição de WD40.

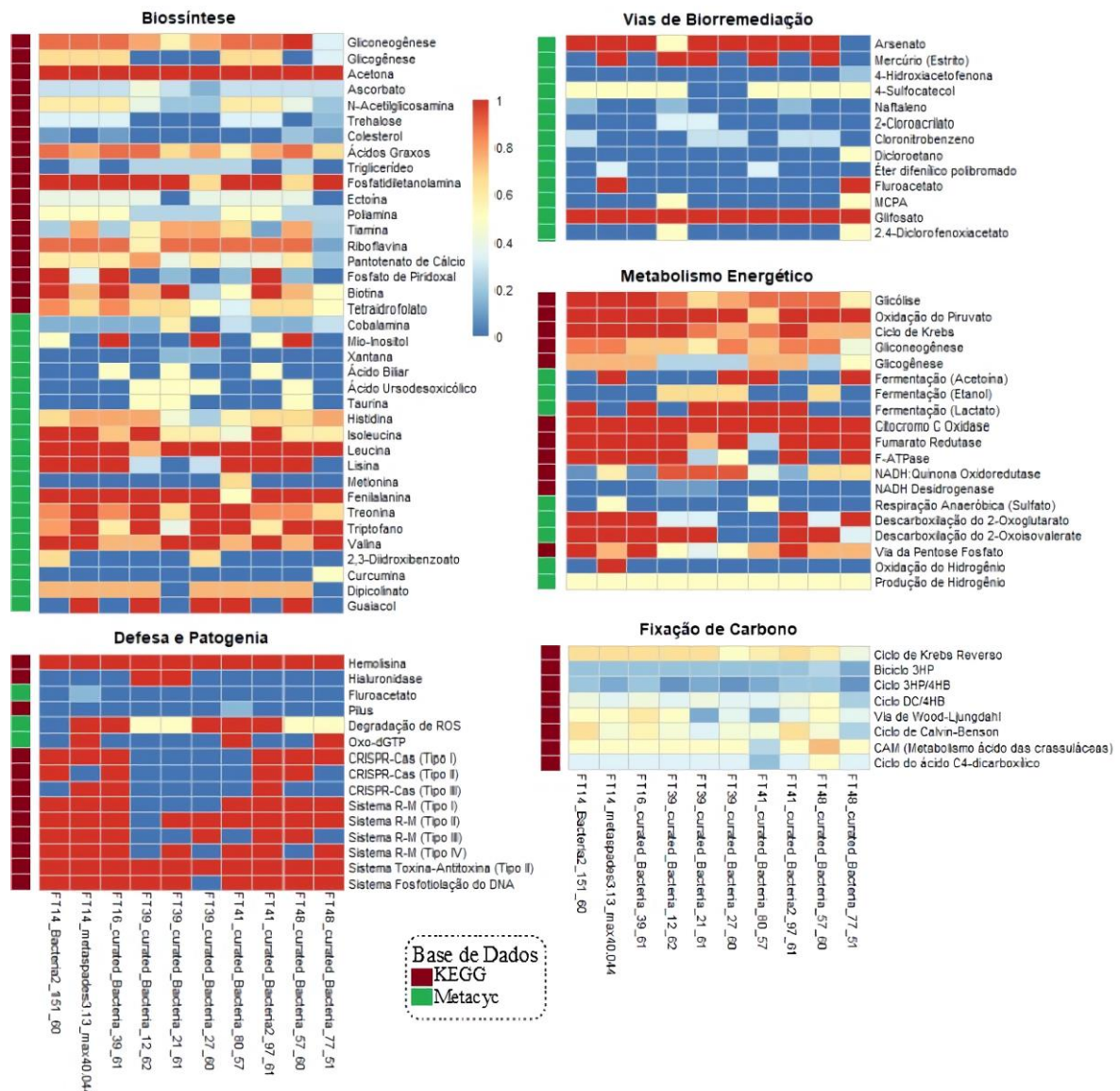


**Figura 8.** Domínios relacionados às proteínas similares às eucarióticos encontrados nos MAGs através do programa CD-Search. ANK = repetição de anquirina; LRR = repetição rica em leucina; NHL = repetição de NCL-1, HT2A e Lin-41; SEL1 = repetição similar a SEL1; TPR = repetição de tetratricopeptídeo; WD40 = repetição de WD40.

## 5.2. RECONSTRUÇÃO METABÓLICA

### 5.2.1. Metabolismos energético e fixação do carbono

Foram identificados processos aeróbicos e anaeróbicos para obtenção de energia, comumente encontrados em organismos heterotróficos, nos MAGs (**Figura 9**). Entre os processos aeróbicos encontra-se: o ciclo de Krebs; a cadeia transportadora de elétrons, presentes os complexos proteicos I (NADH: quinona oxidoreductase), II (succinato desidrogenase), III (citocromo C) e V (F-ATPase); e a formação do ATP.

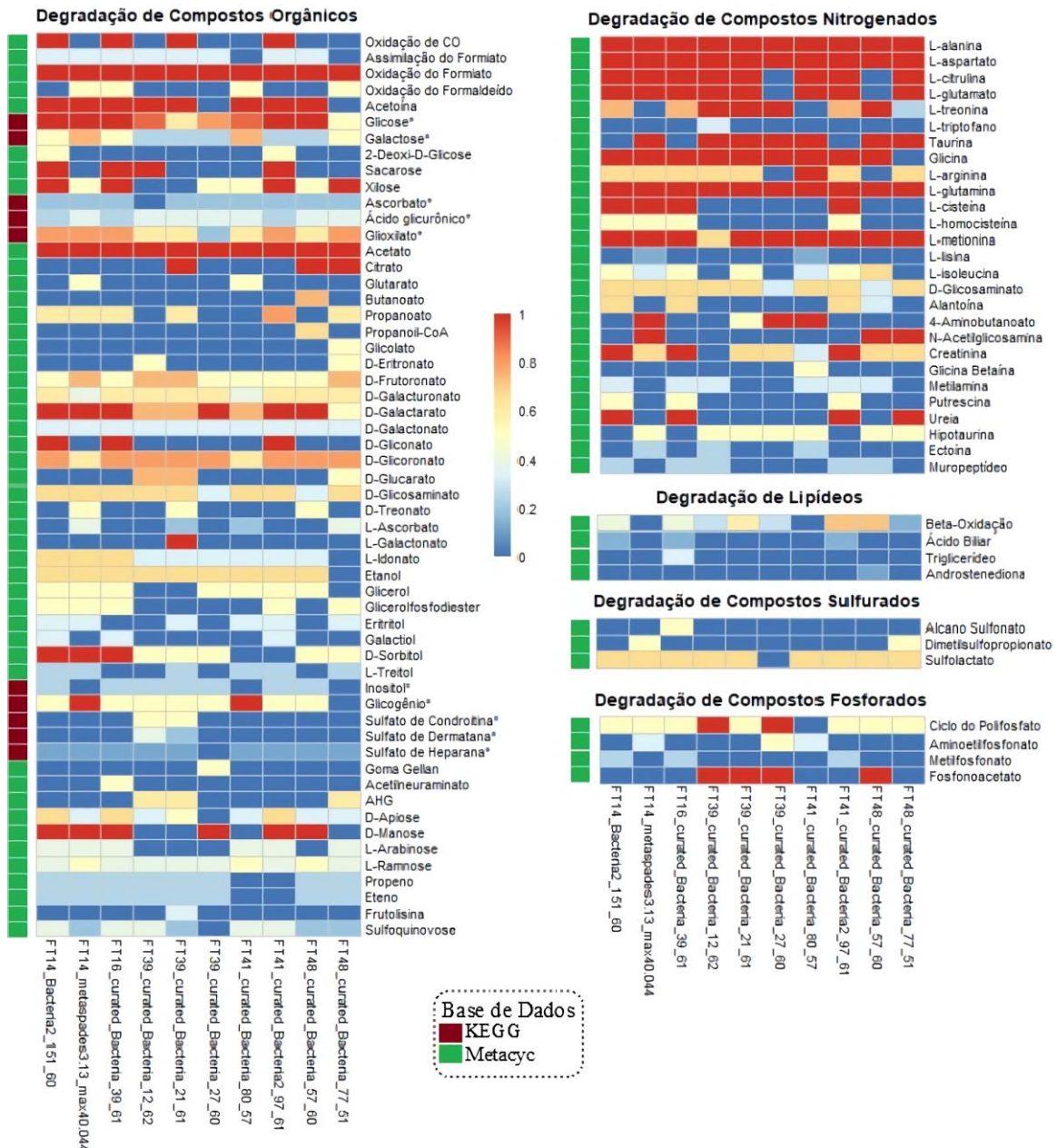


**Figura 9.** Mapa de calor mostrando as vias possivelmente realizados por cada MAG, além da porcentagem de reações possivelmente realizadas por ele com relação ao total de reações das vias, tendo como referência a base de dados KEGG ou MetaCyc. Nesses gráficos, são apresentados dados da reconstrução metabólica sobre a biossíntese de vários tipos de compostos, mecanismos de defesa, fatores de patogenia, vias de biorremediação e de fixação de carbono, e metabolismo energético.

Com relação aos processos anaeróbicos, foram encontrados genes ligados à respiração anaeróbica com o sulfato como aceptor final de elétrons, catalisado pela enzima sulfato adenililtransferase (Sat); e à fermentação do piruvato, podendo resultar em acetoína, sintetizada pela ação das enzimas acetolactato sintase (AlsS) e diacetil redutase (BudC), etanol, mediado pela álcool desidrogenase (Adh), ou lactato, formado devido à enzima lactato desidrogenase (Ldh). Também foram identificados genes relacionados à redução dissimilatória de nitrato à amônia (DNRA), porém apenas uma das subunidades das enzimas nitrato redutase (NarI) e nitrito redutase (NirD) estiveram presentes.

Foram encontradas também vias catabólicas de carboidratos, incluindo a glicólise e a via das pentoses, além de reações de catabolismo de lipídios e proteínas, como a beta-oxidação e vias de degradação de aminoácidos (**Figura 10**). Há ainda genomas que contêm as enzimas hidrogenase e monóxido de carbono desidrogenase, ligadas à produção de energia a partir do hidrogênio e monóxido de carbono, respectivamente.

Finalmente, foram encontradas enzimas que fazem parte de vias de fixação de carbono (**Figura 9**). Contudo, todas as vias estavam incompletas e não foram identificadas enzimas-chave.



**Figura 10.** Mapa de calor mostrando as vias possivelmente realizadas por cada MAG, além da porcentagem de reações possivelmente realizadas por ele com relação ao total de reações das vias, tendo como referência a base de dados KEGG ou MetaCyc. Nesses gráficos, são apresentados dados da reconstrução metabólica sobre a degradação de vários tipos de compostos.

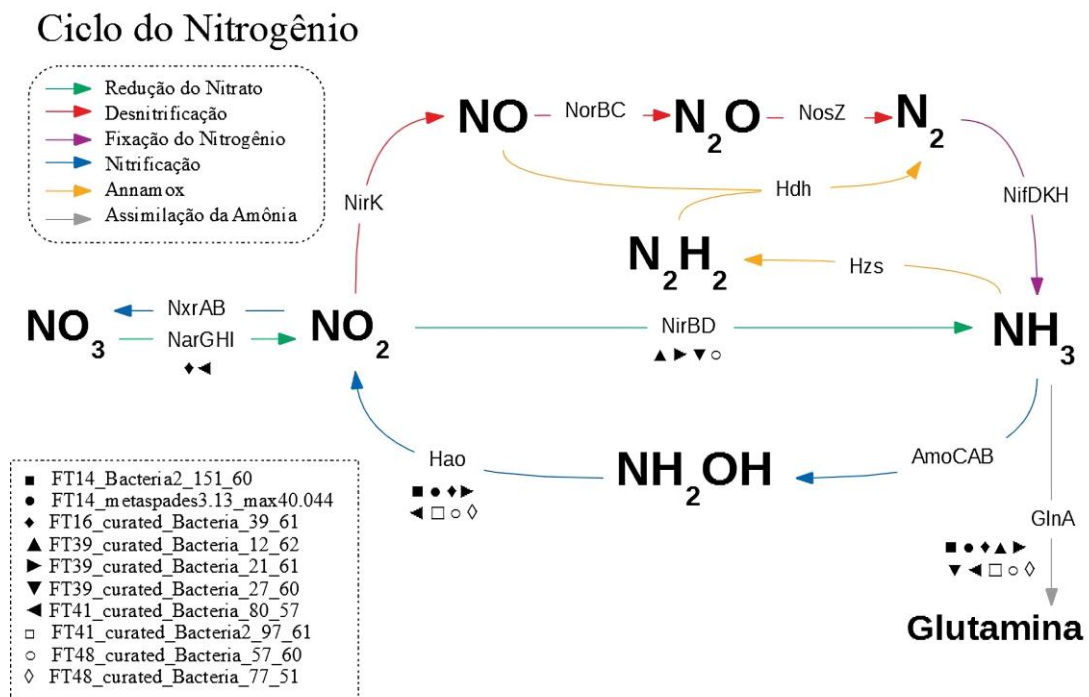
### 5.2.2. Nutrição e biossíntese

Os mapas de calor mostram os possíveis compostos que podem ser degradados e utilizados como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e/ou fósforo. Os compostos possivelmente degradados abrangem desde carboidratos, lipídeos e aminoácidos até tiocompostos e outros compostos nitrogenados e fosforados. Eles mostram também compostos

possivelmente sintetizados, incluindo carboidratos, lipídeos, fosfolipídeos, aminoácidos essenciais e outros compostos nitrogenados, vitaminas, e metabólitos secundários (**Figura 9**). Nesses gráficos, é mostrada a porcentagem de reações possivelmente realizadas por cada MAG com relação ao total de reações que compõem as vias. A possível realização é constatada pela presença de genes que codificam enzimas envolvidas nas reações.

### 5.2.3. Ciclos biogeoquímicos

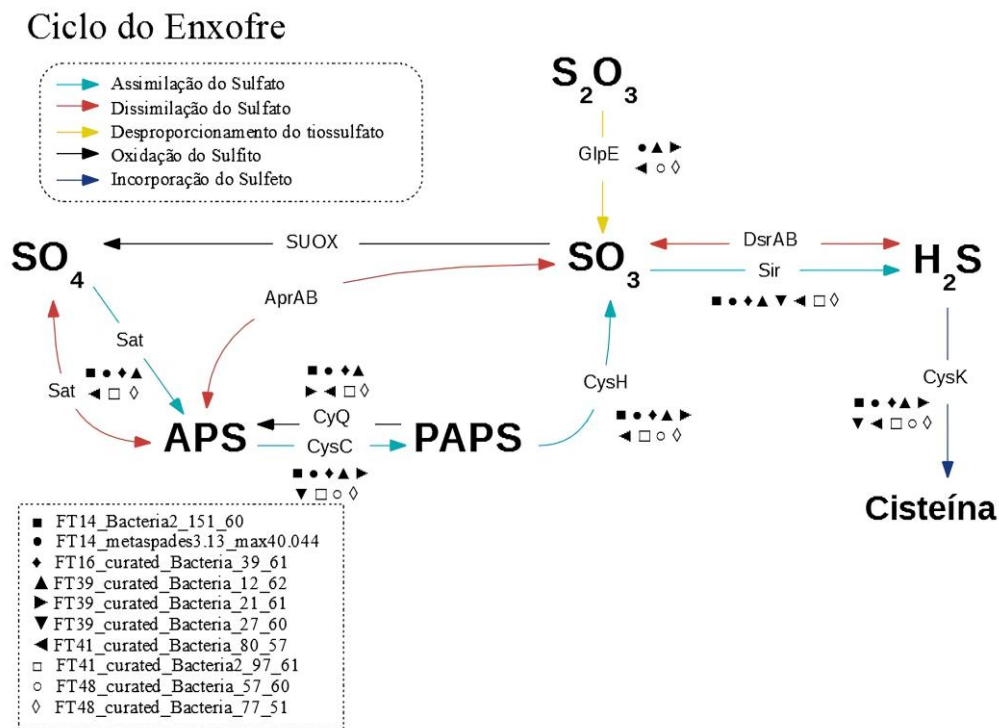
Os MAGs são capazes de produzir enzimas envolvidas em determinadas etapas dos ciclos do nitrogênio, enxofre e fósforo. No caso do ciclo de nitrogênio, foram identificados genes relacionados às reações de oxidação da hidroxilamina em nitrito, redução do nitrato em nitrito e conversão de nitrito em amônia (**Figura 11**). Assim, há possível participação nos processos de nitrificação, interconversão entre nitrato e nitrito, e amonificação por meio da DNRA. Vale destacar que foi identificada apenas uma subunidade das enzimas nitrato redutase (NarI) e nitrito redutase (NirD). Também foi constatada a incorporação de amônia em aminoácidos durante a formação da glutamina a partir do glutamato.



**Figura 11.** Processos do ciclo nitrogênio possivelmente realizados pelas bactérias em estudo. Os símbolos indicam a presença, em determinado MAG indicado, de certo gene envolvido em alguma etapa do ciclo. Nota-se o possível envolvimento nos processos de nitrificação, redução do nitrato e assimilação da amônia.

Quanto ao ciclo do fósforo, foram identificadas vias de degradação de compostos orgânicos fosforados, como os fosfonatos, havendo, assim, uma possível contribuição no processo de remineralização do fósforo. Além disso, está presente o ciclo do polifosfato, via envolvida no armazenamento desse elemento.

Com relação ao ciclo do enxofre, foi identificada a participação nos processos de redução assimilatória de sulfato, redução dissimilatória de sulfato, desproporcionamento do tiosulfato e incorporação do sulfeto para geração da cisteína (**Figura 12**).



**Figura 12.** Processos do ciclo enxofre possivelmente realizados pelas bactérias em estudo. Os símbolos indicam a presença, em determinado MAG indicado, de certo gene envolvido em alguma etapa do ciclo. Nota-se o possível envolvimento nos processos de assimilação e dissimilação do sulfato, desproporcionamento do tiosulfato e incorporação do sulfeto.

#### 5.2.4. Biorremediação

Os MAGs podem estar envolvidos tanto no metabolismo de alguns metais pesados como na degradação de compostos aromáticos ou de cloro capazes de causar danos ao meio ambiente (**Figura 9**). Foram identificadas as enzimas arsenato redutase (ArsC) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gap), relacionadas às transformações de compostos com arsênio em formas menos danosas. Ainda foi constatada a presença da enzima mercúrio redutase (MerA) e da proteína transportadora de mercúrio (MerP), ligadas à resistência ao mercúrio.

Com relação à degradação de compostos orgânicos prejudiciais, as enzimas naftaleno 1,2-dioxigenase (NagAB), 2-amino-5-cloromuconato desaminase (CnbZ), haloalcano dealogenase (DhmA), haloacetato dealogenase (DehH2) e difenil 2,3-dioxigenase (BphA), cujos genes foram encontrados em alguns MAGs, fazem parte das vias de degradação do naftaleno, 4-cloronitrobenzeno, 1,2-dicloroetano, fluoracetato e éter difenílico polibromado (PBDE), respectivamente. Os MAGs também têm o potencial de transformar produtos intermediários das vias de degradação de compostos danosos, entre eles o 4-sulfocatechol, intermediário da quebra de sulfonatos, e 4-hidroxiacetofenona, intermediário do metabolismo de inseticidas e retardantes de chamas. A possível execução dessas reações foi registrada devido à presença da 4-sulfomuconolactona hidrolase (SLMH), protocatechuato 3,4-dioxigenase (PcaHG) e da 4-hidroxiacetofenona monoxigenase (HapE). Por fim, há genes que codificam as enzimas 2,4-diclorofenol 6-monoxigenase (TdfA), envolvida na degradação dos herbicidas 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) e 4-cloro-2-metilfenoxiacetato (MCPA), e glicina oxidase (ThiO), que atua na biorremediação do agrotóxico glifosato.

### 5.2.5. Mecanismos bacterianos de defesa e outras características

Os MAGs apresentam os seguintes mecanismos de defesa: CRISPR-Cas (Tipo I, II e III), sendo identificado o sistema CRISPR-Cas9 no MAG FT16\_curated\_Bacteria\_39\_61; sistema R-M (Tipo I, II, III e IV); sistema toxina-antitoxina (Tipo II); e sistema de fosfotilação do DNA. Além disso, estão presentes os genes KatG e SodA que codificam, respectivamente, as enzimas catalase e superóxido dismutase, envolvidas na degradação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (**Figura 9**).

Ainda foram registrados possíveis fatores de patogenia, entre eles as enzimas hemolisina e hialuronidase. A enzima 5'-fluoro-5'-deoxi-adenosina sintase (Fla), que compõe a via de síntese do fluoracetato, foi encontrada em um dos MAGs (**Figura 9**).

No geral, estão ausentes genes relacionados às estruturas bacterianas de locomoção, com exceção do MAG FT41\_curated\_Bacteria\_80\_57 que possui um dos genes da proteína de montagem do pili (CpaF) do cluster gênico CpaABCDEF.

A reconstrução metabólica também indicou a possível presença de diversos transportadores. O rol de transportadores encontrados nos MAGs, com referência à base de dados KEGG, está registrado na **Tabela 10**. Foram considerados apenas transportadores



completos, ou seja, quando foram identificados todos os genes relacionados a um determinado transportador.

**Tabela 10.** Genes que codificam transportadores encontrados no MAGs.

Transportador	Genes	MAG	Transportador	Genes	MAG
Aldouronato	LplABC	■♦	Ferro (II)	FeoAB	■♦▲▶◀◻◊
Aminoácido de cadeia ramificada	LivFGHKM	◊	Magnésio/ Cobalto	CorC	▼
Divisão celular	FtsEX	●▲▶◀◊	Nicotinamida	PnuC	♦◻
Quitobiase	ChiEFG	■◻	Efluxo de drogas	MexAB-OprM	▲▶
Efluxo de drogas	MdlAB	■♦♦▲▶▼◀◻◊	Efluxo de drogas	MexJK-OprM	■♦♦◻◊
Frutose	FrcABC	◀	Metais pesados	CzcABC	■♦♦▲▶▼◀◻◊
Glicina Betaina/ Prolina	ProWXV	●	Amônia	AmT	■♦♦▲▶▼◀◻◊
Ferro (III)	AfuABC	▼	Fluoreto	YfbK	■♦♦▲▶▼◀◻◊
L-Aminoácido	AapJMPQ	◊	Cromato	CrcB	■♦♦◻◊
Lipopolissacarídeo	LptBFG	■♦♦▶▼◻◊	Magnésio	MgtE	▲▶▼◊
Lipoproteína	LoiCDE	■♦♦▶▼◀◻◊	Vitamina B12	BtuB-TonB	■♦▲▶◻◊
Microcina C	YejABEF	■♦♦◻◊	Aquaporina	NIP_TIP	▲▶◊
Protetor osmótico	OpuABC	◊	Fosfato	OprOP	▼
Fosfato	PstABC	■♦♦▲◻◊	Ácido teicurônico	TuaAB	▼◊
Fosfonato	PhnCDE	▶	Biopolímero	ExbBD-TonB	■♦♦▲▶▼◻◊
Ribose/ Autoindutor-2/ D-Xilose	RsbABC	■♦♦◻◊	Cromato	ChrA	●▲▶◊
Sódio	NatAB	●◊	Efluxo de drogas	EmrE	▲▶
Taurina	TauABC	■◻	Níquel/ Cobalto	RcnA	■♦▼
Ureia	UrtABCDE	■♦◻◊	Potássio	KtrAB	■♦♦◻
Zinco/ Manganês/ Ferro	TroABCD	■♦♦◻◊	Vitamina B1	ThiT	▲
			Zinco/ Cádmio	ZipB	●♦▲▶◻◊

■   FT14_Bacteria2_151_60	▼   FT39_curated_Bacteria_27_60
●   FT14_metaspades3.13_max40.044	◀   FT41_curated_Bacteria_80_57
♦   FT16_curated_Bacteria_39_61	◻   FT41_curated_Bacteria_97_61
▲   FT39_curated_Bacteria_12_62	◊   FT48_curated_Bacteria_57_60
▶   FT39_curated_Bacteria_21_61	◊   FT48_curated_Bacteria_77_51

◻ ABC	◻ Potencial Eletroquímico
◻ Porina	◻ Canal Iônico
◻ RND	◻ Outros

Cada símbolo está relacionado a um MAG enquanto as cores de fundo indicam o tipo de transportador.

### 5.2.7. Resistência e produção de antibióticos

Por meio da reconstrução metabólica, foi possível constatar a presença de enzimas ligadas à produção de antibióticos e à resistência a antimicrobianos. Informações sobre a base de dados onde o gene foi localizado, a classe do antimicrobiano possivelmente produzido, o gene identificado, a enzima codificada e em quais genomas foram encontrados, estão presentes na **Tabela 11**. Por outro lado, a **Tabela 12** apresenta dados acerca dos genes de resistência, contendo informações sobre a base de dados na qual foi identificado, o gene encontrado, de qual classe de antibiótico há resistência e em quais MAGs o gene esteve presente.

**Tabela 11.** Genes relacionados à produção de antibióticos encontrados nos MAGs.

Base de dados	Antibiótico	Enzima	Gene	MAGs
KEGG	Aurachina	PKS cetosintase	AuaC	■●◆▲▶▼◀□◇
	Beta-lactâmico	Isopenicilina-N epimerase	CefD	■◆□◇
		Isopenicilina-N N-aciltransferase	PENDE	■●◆▲▶▼◀□◇
	Fosfomicina	Proteína bifuncional de biossíntese da fosfomicina	FomI	◆□
Piocianina	Trans-2,3-diidro-3-hidroxi-antranilato isomerase	PhzF	▼	
MetaCyc	Aurachina	Aurachina B desidrogenase	AuaH	▼○
	Antraciclina	Aclaviceona redutase	DauE	◇
	Bacilisina	Redutase dependente de NADPH	BacG	○
		Diidroantcapsina 7-desidrogenase	BacC	○
	Canamicina	Canamicina B dioxigenase	KanJ	■●◆□◇
	Cefalosporina	Ácido glutaril-7-aminocefalosporânico acilase	G7AC	●▲▶○
		Cefalosporina-C deacetilase	AxeA	▶▼○
	Lividomicina	6'-hidroxiparamomicina C oxidase	LivQ	■●◆▶◀□◇
	Macrolídeo	Narbonolida/10-deoximethinolida sintase	PikAII	■◆□
	Novobiocina	Decarbamoilnovobiocina carbamoiltransferase	NovN	■●◆□
	Penicilina	Isopenicilina-N epimerase	CefD	■●◆▶▼◀□◇
		Penicilina acilase 2	AcyII	■●◆▶◀□◇
	Pentalenolactona	Pentalenolactona F sintase	PtlD	◇
	Pirrolnitrina	Aminopirrolnitrina oxigenase	PrnD	▼
	Prodigiosina	Enzima condensadora de prodigiosina	PigC	▼○
	Tetraciclina	N,N-dimetiltransferase	OxyT	▲
	Clorotetraciclina	Tetraciclina 7-halogenase	CtcP	■●◆▶◀□◇

■ FT14_Bacteria2_151_60	▼ FT39_curated_Bacteria_27_60
● FT14_metaspades3.13_max40.044	◀ FT41_curated_Bacteria_80_57
◆ FT16_curated_Bacteria_39_61	□ FT41_curated_Bacteria2_97_61
▲ FT39_curated_Bacteria_12_62	○ FT48_curated_Bacteria_57_60
▶ FT39_curated_Bacteria_21_61	◇ FT48_curated_Bacteria_77_51

**Tabela 12.** Genes relacionados à resistência contra antibióticos encontrados nos MAGs.

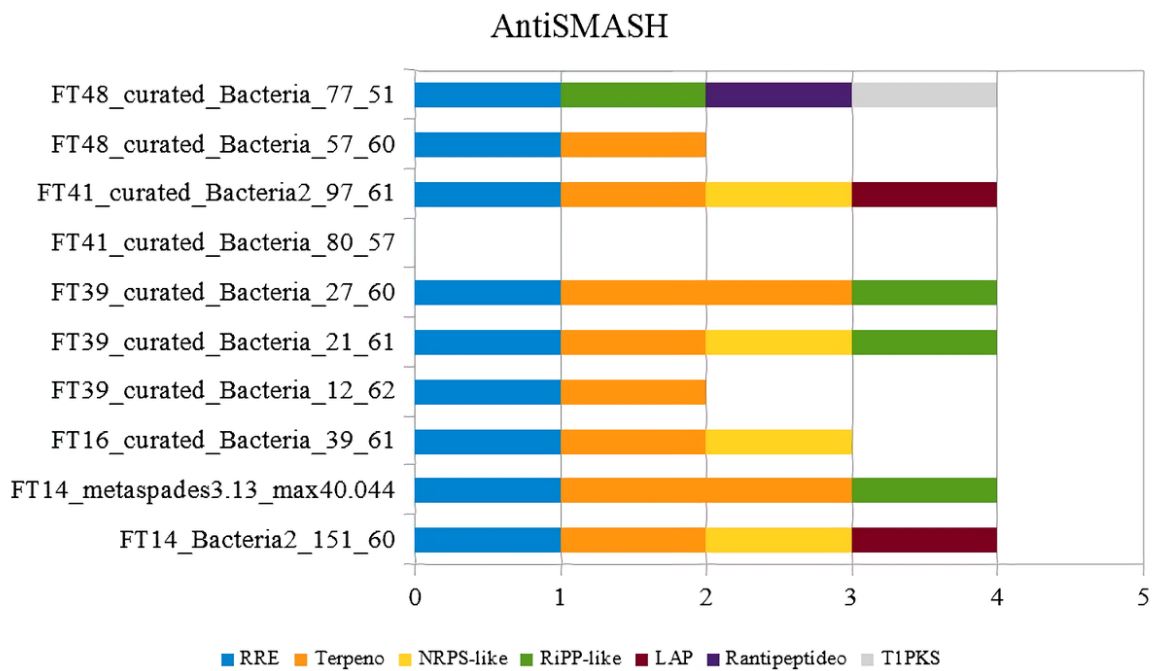
Base de dados	Antibiótico	Proteína	Gene	MAGs
KEGG	Aminoglicosídeo	Aminoglicosídeo 2-fosforansferase	AphD	○
		Aminoglicosídeo 3-N-acetiltransferase	AacC	▲▶▼○◇
		Aminoglicosídeo 6-adenililtransferase	AadK	○
		16S RNA (guanina(1405)-N(7))-metiltransferase	Rmt	▶
		Streptomicina 6-quinase	StrB	◆
	Macrolídeo	Virginiamicina B liase	Vgb	●▶▼◀○
		Transportador MFS	Mef	◇
	Vancomicina	Zinco D-Ala-D-Ala dipeptidase	VanX	■●◆▶
	Múltiplos (MexAB-OprM)	Proteína de fusão	AcrA	▲□
		Bomba de efluxo	AcrB	▲□
		Proteína de membrana externa	OprM	■●◆▶▼◀□◇
	Múltiplos (MexJK-OprM)	Proteína de fusão	MexJ	■●◆◇
		Bomba de efluxo	MexK	■●◆◇
		Proteína de membrana externa	OprM	■●◆▶▼◀□◇
Múltiplos (BpeEF-OprC)	Proteína de fusão	BpeE	▲	
MetaCyc	Penicilina	Metallo-beta-lactamase	CcrA	▶
	Triclosan	Enoil-[proteína carreadora de acil] redutase	FabV	■◆▶▼○

■ FT14_Bacteria2_151_60	▼ FT39_curated_Bacteria_27_60
● FT14_metaspades3.13_max40.044	◀ FT41_curated_Bacteria_80_57
◆ FT16_curated_Bacteria_39_61	□ FT41_curated_Bacteria2_97_61
▲ FT39_curated_Bacteria_12_62	○ FT48_curated_Bacteria_57_60
▶ FT39_curated_Bacteria_21_61	◇ FT48_curated_Bacteria_77_51

### 5.3. COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

#### 5.3.3. Compostos bioativos

Foram encontrados *clusters* de genes relacionados à produção de metabólitos secundários em todos os MAGs, com exceção do FT41\_curated\_Bacteria\_80\_57. Os *clusters* são relacionados à produção de terpeno, proteína similar à sintase de peptídeos não ribossomais (NRPS-like), peptídeo linear contendo azol ou azolina (LAP), policetídeo sintase tipo I (T1PKS), rantipeptídeo, peptídeo contendo elemento de reconhecimento de RiPP (RRE), e outros tipos de peptídeo sintetizado no ribossomo e modificado após a tradução (RiPP-like) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Resultado do antiSMASH mostrando a quantidade de *clusters* gênicos relacionados à produção de determinado tipo de metabólito secundário, encontrados em cada MAG. Cada cor indica um tipo de *cluster*. Em um dos MAGs, nenhum *cluster* foi identificado. NRPS-like = proteína similar à sintase de peptídeos não ribossomais; LAP = peptídeo linear contendo azol ou azolina; T1PKS = policetídeo sintase tipo I; RRE = peptídeo contendo elemento de reconhecimento de RiPP; RiPP-like = outros tipos de peptídeo sintetizado no ribossomo e modificado após a tradução.

#### 5.3.2. Enzimas de interesse biotecnológico

Das enzimas citadas na **Tabela 2**, foram encontradas, nos MAGs, aquelas presentes na **Tabela 13**. Nessa tabela consta ainda o número EC e em quais MAGs elas foram encontradas,

além de possíveis áreas de aplicação e a sua função em tal área, informações estas extraídas da base de dados BRENDA. Especificamente sobre as enzimas de degradação de peptídeos e proteínas, foram encontradas peptidases da família das quimotripsinas e subtilisinas, além de

**Tabela 13.** Genes para enzimas de interesse biotecnológico encontrados nos MAGs.

Enzima	Número EC	MAG	Aplicação
Álcool desidrogenase	EC 1.1.1.1	■●◆▲▶▼◀◻◇	Síntese de intermediários quirais Produção de etanol
Glicerol desidrogenase	EC 1.1.1.6	■●◆◻◇	Geração de biocombustível a partir da fermentação do glicerol Síntese de compostos quirais
Catalase	EC 1.11.1.6	■●◆▼◻◇	Uso na produção de leite Remoção de resíduos indesejados
Hydrogenase	EC 1.12.--	●▼	Geração de energia em células de biocombustível
Dioxigenase	EC 1.13.12.-	■●◆▲▶▼◀◻◇	Transformação de compostos aromáticos e outros hidrocarbonetos
Monooxigenase	EC 1.14.13.-	■●◆▲▶▼◀◻◇	Transformação de compostos aromáticos e outros hidrocarbonetos
Enzima ramificadora de glicogênio	EC 2.4.1.18	■●◆◻	Produção de polissacarídeos
Esterase	EC 3.1.1.-	■●◆▲▶▼◀◻◇	Produção de emulsificantes Síntese de fármacos Degradação de piretroides
Lipase	EC 3.1.1.3	◆	Melhoramento de alimentos e síntese de ingredientes Tratamento de doenças no sistema digestório Síntese de biodiesel Remoção de resíduos indesejados do papel Remoção de óleos e gorduras de águas residuais
Fosfolipase	EC 3.1.1.32	◻◇	Uso na produção de leite Degomagem de óleos de plantas
Fosfatase alcalina	EC 3.1.3.1	●◆▼◀◇	Uso em ensaios imunoenzimáticos e clonagem genética
Hialuronidase	EC 3.2.1.35	◆▲▶	Melhorar a distribuição de fármacos em animais
Alfa-Glicosidase	EC 3.2.1.20	■●◆◻◇	Síntese de oligossacarídeos Produção de bioetanol
Endoglucanase	EC 3.2.1.-	■◆◻	Melhoramento e limpeza de tecidos e papel
Alfa-Galactosidase	EC 3.2.1.22	■●◆▲◀◇	Processamento do leite de soja Remoção de lactose
Beta-Galactosidase	EC 3.2.1.23	●◇	Aliviar sintomas de intolerância à lactose
Beta-Frutofuranosidase	EC 3.2.1.26	■●◆◻◇	Produção de açúcares e prebióticos
Alfa-Ramnosidase	EC 3.2.1.40	■●◆▲▶▼◇	Melhorar o sabor de vinhos Uso na produção de vinho
L-Arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	■▲◻	Tratamento da polpa de celulose Melhorar a digestão da ração para animais
Epóxido hidrolase	EC 3.3.2.9	◇	Síntese de compostos quirais
Protease	EC 3.4.--	■●◆▲▶▼◀◻◇	Processamento de carnes e síntese do aspartame Debridamento de feridas e tratamento de doenças gastrointestinais Síntese de peptídeos Remoção de manchas em tecidos
Aminopeptidase	EC 3.4.11.-	■●◆▲▶▼◀◻◇	Remoção do amargor de alimentos Tratamento de tumores
Glutaminase	EC 3.5.1.2	●○	Fermentação do molho de soja e melhoramento do sabor
Amidase	EC 3.5.1.4	■●◆▲◻◇	Síntese de peptídeos e acrilamida Tratamento de águas contendo acetonitrila
Urease	EC 3.5.1.5	■◆◻◇	Uso em equipamentos de hemodiálise Remoção da ureia em bebidas alcoólicas
Dealogenase	EC 3.8.1.-	■●◆▲◻◇	Degradação de haletos orgânicos
Nitrila hidratase	EC 4.2.1.84	▲▶▼○	Síntese de amidas Remoção compostos nitrilados em águas residuais
Alginato-liase	EC 4.2.2.-	▶▼○◇	Coadministrado com antibióticos para melhorar sua eficácia Possível produção de biocombustível a partir do alginato Síntese de oligossacarídeos de alginato
L-Ramnose isomerase	EC 5.3.1.14	●◆▶◻◇	Produção de açúcares raros
Xilose isomerase	EC 5.3.1.5	■●◆◻◇	Produção de xarope Geração de biocombustível a partir de material lignocelulósico

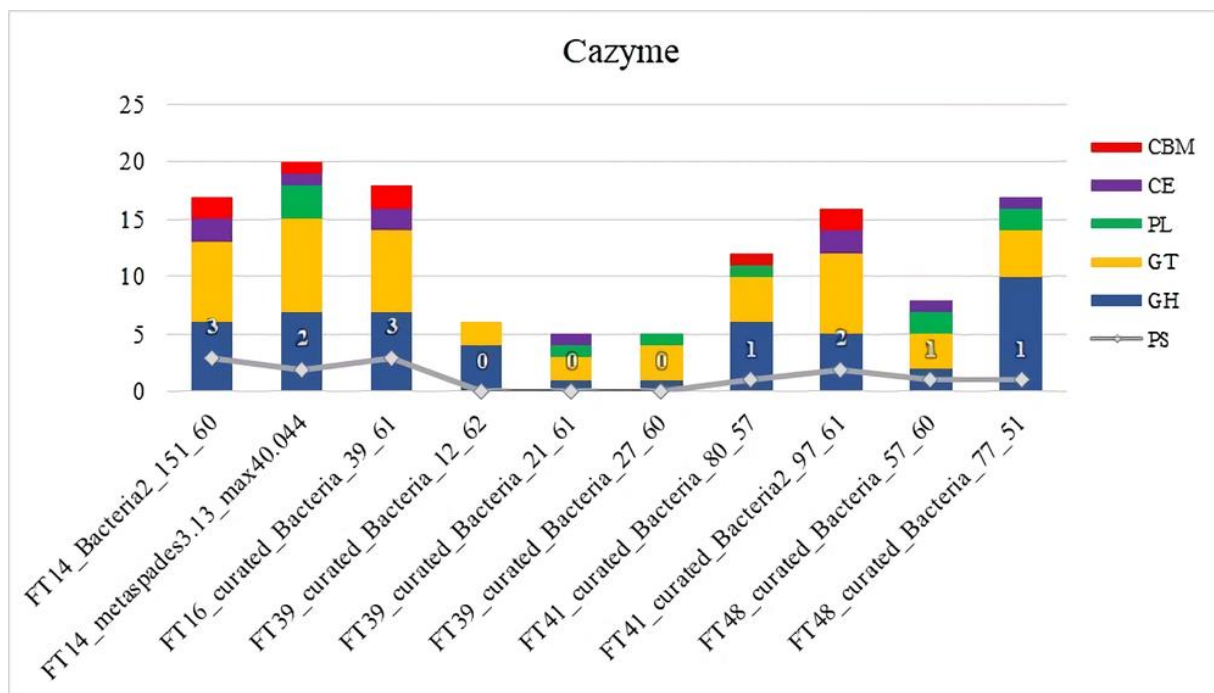
■   FT14_Bacteria2_151_60	▼   FT39_curated_Bacteria_27_60
●   FT14_metaspad3.13_max40.044	◀   FT41_curated_Bacteria_80_57
◆   FT16_curated_Bacteria_39_61	◻   FT41_curated_Bacteria2_97_61
▲   FT39_curated_Bacteria_12_62	○   FT48_curated_Bacteria_57_60
▶   FT39_curated_Bacteria_21_61	◇   FT48_curated_Bacteria_77_51

■	Oxidoreductase
●	Transferase
◆	Hidrolase
▲	Liase
▶	Isomerase

Cada símbolo corresponde a um MAG diferente enquanto as cores de fundo indicam o tipo de enzima. As serina peptidase e cisteína proteases foram agrupados como "Protease".

outras serina peptidases não específicas. Também estão presentes cisteíno proteases, entre elas a papaína, e a termolisina. Na **Tabela 13**, todas essas enzimas foram agrupadas como proteases.

Já o programa dbCAN2 encontrou vários genes presentes na base de dados CAZy. Foi constatada a presença dos seguintes módulos: hidrolase glicosídica (GH); glicosiltransferase (GT); polissacarídeo liase (PL); carboidrato esterase (CE); e módulo de ligação ao carboidrato (CBM). O módulo de atividade auxiliar (AA) esteve ausente. Cabe ressaltar que algumas sequências apresentaram peptídeo sinal. Informações sobre esses achados podem ser encontrados na **Figura 14**.

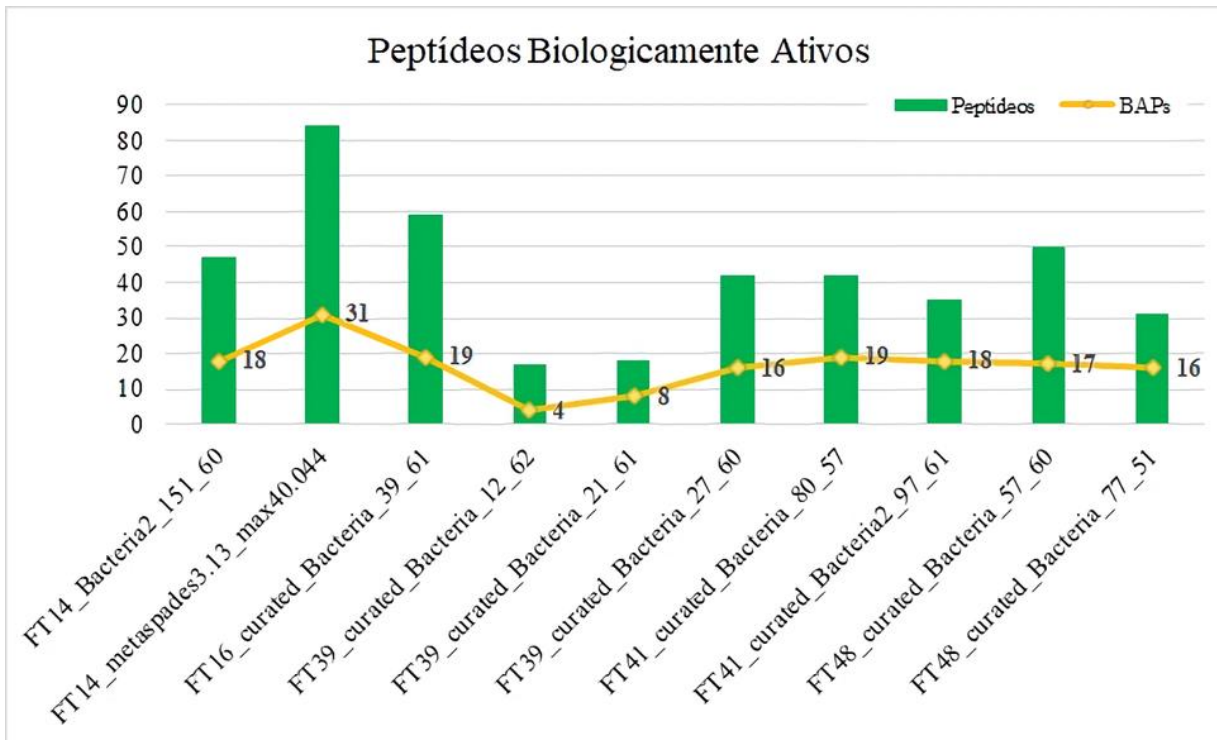


**Figura 14.** Resultado da busca por enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos na base de dados CAZy, feita no dbCAN2. As barras mostram a quantidade genes encontrados para cada classes de enzimas, com cada cor distinta representando uma classe. A linha azul mostra a quantidade de genes que possuem peptídeo-sinal. GH = hidrolase glicosídica; GT = glicosiltransferase; PL = polissacarídeo liase; CE = carboidrato esterase; CBM = módulo de ligação ao carboidrato.

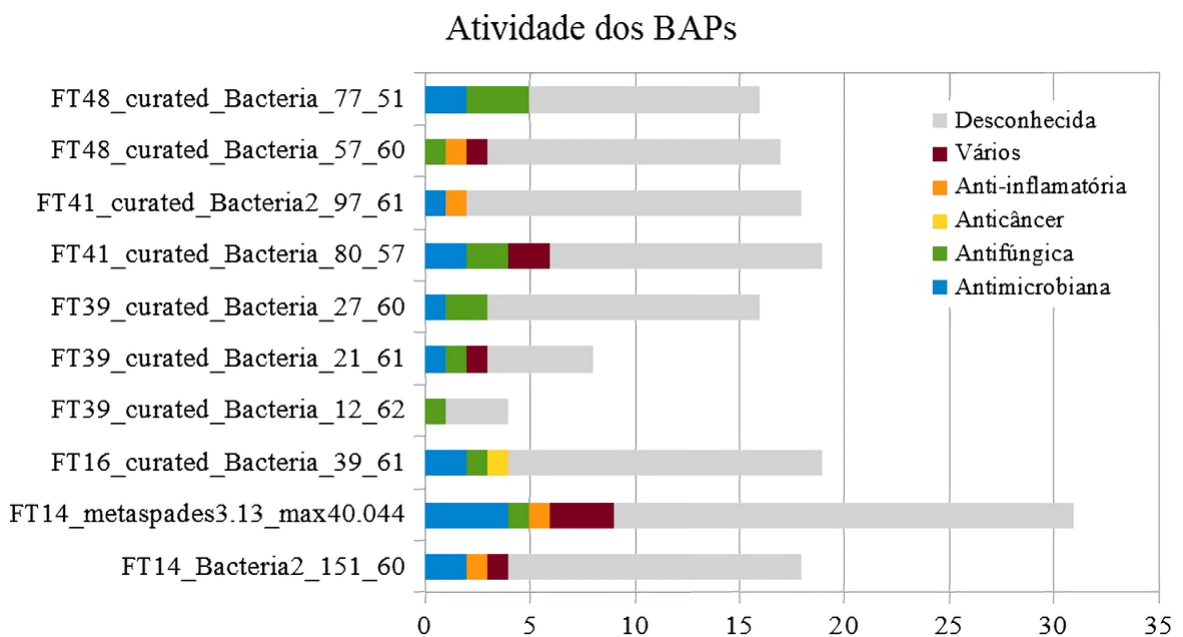
### 5.3.3. Peptídeos biologicamente ativos

Em cada um dos MAGs, foram identificadas dezenas de peptídeos, ou seja, sequências com 100 resíduos de aminoácido ou menos. Desses, menos da metade foram classificados como peptídeos biologicamente ativos pelo PeptideRanker (**Figura 15**). Na maior parte dos BAPs não houve predição de função biológica, mas foi possível encontrar peptídeos com provável atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e anticâncer. Em alguns deles, mais de

um tipo de atividade foi predita (**Figura 16**). Por outro lado, o programa Toxinpred não identificou atividade de toxina em nenhum peptídeo.



**Figura 15.** Quantidade de seqüências com menos de 100 resíduos encontradas em cada MAG, indicada pela barra verde, e a quantidade de peptídeos que foram designados como biologicamente ativos pelo programa PeptideRanker, indicado pela linha amarela. BAP = peptídeo biologicamente ativo.



**Figura 16.** Atividades biológicas preditas nos peptídeos encontrados. Peptídeos com mais de um tipo de atividade predita foram designados como "Vários". Peptídeos com resultado negativo em todos programas foram designados como "Desconhecida". BAP = peptídeo biologicamente ativo.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. ANÁLISE FILOGENÔMICA

#### 6.1.1. Qualidade dos MAGs

Os MAGs apresentaram uma qualidade entre média e alta, com completude variando em 71,43% a 97,74% e contaminação com valores entre 0% e 6,59%. Esses parâmetros podem ajudar a explicar o predomínio de vias metabólicas incompletas durante a reconstrução do metabolismo dos genomas montados. A qualidade da montagem é essencial para o processo de anotação, podendo afetar a quantidade e a qualidade dos genes identificados (FLOREA *et al.*, 2011). Outra hipótese que pode explicar a incompletude dos genomas refere-se à presença de genes alternativos codificadores de enzimas ainda desconhecidas, que talvez atuem nas reações faltantes (LANNES *et al.*, 2019). Cabe ressaltar que, em algumas vias, pode haver uma cooperação com outros organismos da comunidade para completar o processo metabólico. Por meio da divisão metabólica do trabalho, diferentes populações executam reações complementares de uma via, como pode ser visto na nitrificação. Dessa forma, as vias são divididas em múltiplas etapas e as populações agem em algumas delas (EMBREE *et al.*, 2015; TSOI *et al.*, 2018). Os microrganismos também podem interagir com o hospedeiro em um mecanismo de cossíntese ou cometabolismo. No caso das esponjas, poderia haver uma integração entre genes do simbionte e do hospedeiro completando a via, ou o produto das reações de um organismo poderia atuar como precursor na via do outro (SELVIN *et al.*, 2010).

É importante destacar que todas as inferências foram feitas em sequências de DNA, não havendo informações acerca da expressão dos genes. Assim, a presença de um certo gene no MAG não implica na execução de um processo determinado, existindo apenas um potencial de sua realização.

#### 6.1.2. Classificação taxonômica

Todos os genomas montados apresentaram a mesma classificação taxonômica em nível de classe. Tendo como referência o GTDB, eles fazem parte do filo candidato Latescibacterota e da classe UBA2968, cujos membros são mencionados na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Membros da classe UBA2968 do filo *Latescibacterota*.

NCBI ID	Isolado	NCBI – Classificação	GTDB – Classificação
GCA_002714465.1	SAT128	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp002714465
GCA_009838845.1	SB0664_bin_24	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__VXR01; s__VXR01 sp009838845
GCA_903893785.1	LaPlata_bin-0729	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__CAITN001; s__CAITN001 sp903893785
GCA_002693325.1	EAC654	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__GCA-2693325; s__GCA-2693325 sp002693325
GCA_002724215.1	R822	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__GCA-2724215; s__GCA-2724215 sp002724215
GCA_002725915.1	NP952	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__GCA-2725915; s__GCA-2725915 sp002725915
GCA_002712305.1	SAT162	d__Bacteria; p__Gemmatimonadetes; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA12574; s__UBA12574 sp002712305
GCA_009694805.1	Baikal-deep-G205	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp009694805
GCA_002346505.1	UBA2998	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__GCA-2709665; g__GCA-2709665; s__GCA-2709665 sp002709665
GCA_012270675.1	Pitut_88899	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__GCA-2709665; g__JAAXHW01; s__JAAXHW01 sp012270675
GCA_002348785.1	UBA2968	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp002348785
GCA_003444455.1	UBA9260	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp003444455
GCA_007129025.1	CSSed162cmB_194R1	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__SLHA01; s__SLHA01 sp007129025
GCA_007136405.1	CSSed165cm_126R1	d__Bacteria; p__Candidatus Latescibacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__SLHA01; s__SLHA01 sp007136405
GCA_001781055.1	RIFCSPL0W02_12_FULL_64_10	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp001781055
GCA_016867395.1	K_DeepCat_65m_m1_133	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp016867395
GCA_012960375.1	UWMA-0300	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp012960375
GCA_012960645.1	UWMA-0286	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__UBA2968; s__UBA2968 sp012960645
GCA_003567195.1	T3Se410_195R1	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__SLHA01; s__SLHA01 sp003567195
GCA_003562965.1	CSSed11_174	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__SLHA01; s__SLHA01 sp003562965
GCA_003529655.1	CSSed10_203R1	d__Bacteria; p__Candidatus Handelsmanbacteria; c__o__; f__; g__; s__	d__Bacteria; p__Latescibacterota; c__UBA2968; o__UBA2968; f__UBA2968; g__SLHA01; s__SLHA01 sp003529655

Além da classificação taxônomica com base no GTDB, estão descritos os identificadores do NCBI e a classificação registrada no NCBI.

Os MAGs compartilham algumas características vistas anteriormente em algumas bactérias pertencentes a essa classe. Por exemplo, alguns estudos demonstraram a participação delas nos ciclos do nitrogênio, nos processos de redução do nitrato e de oxidação e redução do nitrito, e enxofre, na etapa de redução do sulfato (ROBBINS *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2019; CABELLO-YEVES *et al.*, 2020; ENGELBERTS *et al.*, 2020). Também foi registrada a presença de genes relacionados à glicólise, respiração aeróbica, e uso do hidrogênio e monóxido de carbono como fonte de energia (ANANTHARAMAN *et al.*, 2016; VAVOURAKIS *et al.*, 2018; TRAN *et al.*, 2019). Vias de biossíntese e biorremediação, como a produção de vitaminas, metabolização do arsênio, e degradação de compostos halogenados, já foram constatadas (ROBBINS *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2019; ENGELBERTS *et al.*, 2020). Em contrapartida, foram descritas vias de fixação de carbono nessa classe, incluindo o 3HP/4HB, o ciclo de Calvin e a via de Wood-Ljungdahl, porém elas estão ausentes ou parcialmente presentes, sem as enzimas-chave, nos MAGs sob análise (VAVOURAKIS *et al.*, 2018; TRAN *et al.*, 2019).

## 6.2. METABOLISMO

### 6.2.1. Metabolismo energético e fixação do carbono

Os MAGs apresentam metabolismo típico de bactérias heterotróficas, coexistindo processos aeróbicos e anaeróbicos para obtenção de energia. A heterotrofia é uma característica



frequentemente encontrada em bactérias associadas às esponjas, além de ser bastante comum nas camadas do Recife Amazonas com menor incidência de luz (TAYLOR *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2016). Além disso, microrganismos simbiotes de esponjas geralmente são aeróbicos, em razão da oxigenação contínua perpetuada pelo bombeamento de água realizado pela esponja. Contudo, já foi registrada a presença de anaeróbicos facultativos e de bactérias redutoras de sulfato, possivelmente devido às variações no bombeamento que podem gerar momentos de anaerobiose (OSINGA *et al.*, 2001). E ainda, vias anaeróbicas, como DNRA, dissimilação do sulfato, annamox e desnitrificação, são frequentemente encontradas em esponjas de zonas abissais (THOMAS *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014).

Outro processo presente em áreas turvas do Recife Amazonas, ainda que minoritariamente, é a fixação carbono (MOURA *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2022). Diferentes vias de fixação de carbono já foram relatadas em simbiotes de esponjas, especialmente em cianobactérias (FENG e LI, 2019). Entretanto, nos MAGs, todas as vias de fixação estavam incompletas ou ausentes, não apresentando genes para enzimas-chave.

Um mecanismo possivelmente utilizado por algumas MAGs para aquisição de energia é a redução do gás hidrogênio e outros substratos hidrogenados pela ação da hidrogenase, processo largamente utilizado por microrganismos, vindos de diversos ambientes para seu crescimento e sobrevivência (VIGNAIS e COLBEAU, 2004; GREENING *et al.*, 2016). Também foi registrada a presença da enzima monóxido de carbono desidrogenase, comumente evidenciada em simbiotes lithoheterotróficos de esponjas, que possibilita o uso do monóxido de carbono, composto intermediário do metabolismo anaeróbico do carbono, para conservação de energia ou como fonte principal de carbono (TRINDADE-SILVA *et al.*, 2012; ROBB e TECHTMANN, 2018; FENG e LI, 2019; BURGS DORF *et al.*, 2022).

### **6.2.2. Biossíntese**

Os MAGs contêm vários genes relacionados à biossíntese de compostos, entre eles a ectoína, mio-inositol e fosfatidiletanolamina, que podem ajudar tanto o simbiote como a esponja a prosperar no ambiente onde habitam. A ectoína é um pequeno composto orgânico que confere resistência ao estresse osmótico e a variações na temperatura, podendo ajudar na sobrevivência em ambientes de alta salinidade como o mar. Ela está geralmente associado às bactérias halotróficas e halotolerantes, mas pode ser encontrado em diversos tipos de microrganismos de filos distintos, incluindo bactérias marinhas e associadas a outros seres

(HERMANN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021). O mio-inositol é um composto orgânico sintetizado tanto por procariotos como por eucariotos. Em eucariotos, ele é precursor do fosfatidilinositol, um componente estrutural da membrana, e de moléculas ligadas à transdução de sinais, além de servir como osmólito em células animais. Já nos procariotos, produtos contendo inositol fazem parte da membrana ou parede celular de algumas espécies, podendo ser usados na proteção do microrganismo contra o estresse osmótico e tiocompostos reativos, atuando também no reconhecimento de células-alvo em patógenos (ROBERTS, 2006; REYNOLDS, 2009). As bactérias estudadas ainda poderiam contribuir na geração de fosfatidiletanolamina, fosfolípídeo que compõe a membrana de células de esponjas e a membrana interna de certas bactérias (MURZYN; ROG; PASENKIEWICZ-GIERULA, 2005; GENIN *et al.*, 2008).

### 6.2.3. Outras Características

Outra característica presente nos MAGs refere-se à resistência aos antimicrobianos da **Tabela 12**. Genes de resistência podem ser encontrados em uma gama de ambientes, incluindo mares, rios e animais, podendo contribuir na disseminação de tais genes. As esponjas são uma reserva conhecida desse tipo de genes, sendo possível encontrar genes nunca descritos (VERSLUIS *et al.*, 2016). Ainda não se sabe o papel ecológico desses genes, porém a presença de antibióticos contaminantes pode exercer uma pressão seletiva por resistência na flora nativa (LAPORT *et al.*, 2016).

Na maioria dos MAGs, estão ausentes mecanismos de locomoção, com exceção de um que apresentou um sistema de pilus incompleto. Grande parte dos microrganismos associados às esponjas não apresentam mecanismos de motilidade, indicando um modo imóvel de vida dentro do meso-hilo (PITA *et al.*, 2018).

## 6.3. ASSOCIAÇÃO COM ESPONJAS

### 6.3.1. Simbiose

As esponjas dispõem de certos mecanismos que ajudam a estabelecer a relação de simbiose com sua microbiota associada. Por exemplo, elas conseguem reconhecer e diferenciar micróbios para alimentação dos simbiontes por meio de sinalização imune. A presença de ELPs e de modificações no lipopolissacarídeo pode estar ligada à evasão da fagocitose (THOMAS *et*

*al.*, 2010; WEBSTER e TAYLOR, 2012; PITA *et al.*, 2018). Em eucariotos, esses domínios estão envolvidos na interação entre proteínas e participam de diversos processos como iniciação da transcrição, regulação do ciclo celular e transdução de sinal (KIRAN *et al.*, 2018).

Nos MAGs, foram evidenciadas as seguintes classes de ELPs: repetição de anquirina, fibronectina tipo III, repetição rica em leucina, repetição de NHL, NipSnap, PQQ, repetição similar a SEL-1, repetição de tetratricopeptídeo, e WD40. As ELPs são frequentemente achadas em simbioses, incluindo as de esponjas, e todos os domínios encontrados já foram descritos nessa categoria de microrganismo (REYNOLDS e THOMAS, 2016; DÍEZ-VIVES *et al.*, 2017; FRANK, 2019).

### 6.3.2. Nutrição

Microrganismos associados às esponjas participam de diversos processos apresentando diferentes papéis ecológicos, incluindo na nutrição da esponja. No caso das bactérias em estudo, há várias contribuições possíveis que elas podem oferecer ao hospedeiro. Por exemplo, os MAGs possuem genes codificadores de enzimas ligadas à degradação de substratos complexos, entre elas proteases e lipases, podendo deixá-los mais facilmente acessíveis à esponja (SELVIN *et al.*, 2010; PITA *et al.*, 2018). Esponjas também podem consumir microrganismos simbioses ou vindos da água para suprir as necessidades de fósforo e carbono (TAYLOR *et al.*, 2007).

Além disso, organismos simbioses podem sintetizar substâncias que são utilizadas pelo hospedeiro para diversos fins. Um exemplo são os ácidos carboxílicos transferidos para a esponja que os usa na produção de outros compostos. Estes ácidos são gerados durante o processo de redução do sulfato, reação possivelmente realizada por quase todos os MAGs (TAYLOR *et al.*, 2007). E ainda, a conversão de ureia em amônia realizada por bactérias através da urease, enzima constatada em alguns MAGs, contribui para a síntese de proteínas da esponja (SELVIN *et al.*, 2010). Vale ressaltar que foram identificados nos MAGs genes ligados à produção de compostos essenciais, dos quais o hospedeiro não sintetiza naturalmente, como as vitaminas B1 e B12, além dos aminoácidos fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina. Simbioses de esponjas geralmente estão enriquecidas com esses genes, podendo suprir a demanda do hospedeiro (HENTSCHEL *et al.*, 2012; PITA *et al.*, 2018; ROBBINS *et al.*, 2021).

### 6.3.3. Defesa

Outra função relevante possivelmente realizada consiste na defesa do hospedeiro. Os MAGs descritos têm o potencial de produzir antibióticos, peptídeos biologicamente ativos e outros metabólitos secundários com propriedades de antibiose. A produção de substâncias tóxicas a outros microrganismos aliada a outros mecanismos como competição com patógenos por espaço e nutrientes, a predação de invasores, a alteração da fisiologia da esponja e treinamento do sistema imune ajudam a impedir que patógenos colonizem o hospedeiro (SELVIN *et al.*, 2010)

Além disso, genes relacionados às proteínas do estresse, enzimas defensivas (e.g. fosfolipases) e sistemas de defesa ajudam a proteger a esponja contra compostos danosos e organismos estranhos dos quais ela é exposta graças ao bombeamento de água (SELVIN *et al.*, 2010; PITA *et al.*, 2018). Dentre os mecanismos de defesa, foram encontrados nos MAGs os sistemas de: (1) R-M, mecanismo em que há reconhecimento do material genético próprio por meio da metilação e destruição de DNA não modificado, ajudando também a manter a integridade da interação entre o simbionte e o hospedeiro (ROCHA e BIKARD, 2022); (2) tiosforilação do DNA, sistema similar ao R-M, com tiosforilação no lugar da metilação (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2013); (3) CRISPR-Cas, que confere imunidade adaptativa com base na destruição de material genético estranho por nucleases guiadas por sequências (ROCHA e BIKARD, 2022); e (4) toxina e antitoxina do tipo II, no qual uma pequena proteína neutraliza a toxina por meio de interação proteína-proteína (UNTERHOLZER; POPPENBERGER; ROZHON, 2013). Genes de defesa, especialmente do sistema CRISPR e de tiosforilação do DNA, podem estar enriquecidos no microbioma de esponja (HORN *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2010).

Os MAGs ainda contêm enzimas antioxidantes, entre elas a superóxido dismutase e catalase, podendo contribuir no controle do estresse oxidativo. A presença de simbiontes em esponjas melhora a defesa contra espécies oxidativas de oxigênio, através da atividade aumentada das enzimas antioxidantes e da maior capacidade de neutralização (REGOLI *et al.*, 2000). Embora a fotossíntese não seja um processo predominante na microbiota de esponjas provenientes do Recife Amazonas (PINTO *et al.*, 2022), é válido ressaltar que alguns desses invertebrados albergam fotossintetizantes, possuindo assim uma demanda maior por esse tipo de proteção, devido ao aumento na concentração de oxigênio molecular, gerado durante a fotossíntese. (TAYLOR *et al.*, 2007).

#### 6.3.4. Desintoxicação

Mais uma função possivelmente realizada refere-se à eliminação de substâncias que podem ser tóxicas à esponja, como a amônia e o sulfeto de hidrogênio. Os MAGs têm o potencial de executar a oxidação e assimilação da amônia, uma das principais excretas geradas por esponjas, que pode ser tóxica para eucariotos, dependendo da sua concentração. A amônia está associada à morte tecidual, podendo se acumular nos tecidos das esponjas em períodos de pouco bombeamento da água (WEBSTER e TAYLOR, 2012; PITA *et al.*, 2018). Quanto ao sulfeto de hidrogênio, em grandes concentrações, ele pode ser tóxico em ambientes aquáticos, afetando animais e plantas (BAGARINAO, 1992). Sua oxidação ajuda a evitar seu acúmulo e efeitos tóxicos à esponja, possibilitando também a vivência em ambientes ricos em sulfetos (TAYLOR *et al.*, 2007). Embora a reação de oxidação esteja ausente nos MAGs, o processo de incorporação do sulfeto na cisteína, presente em todos os MAGs, pode contribuir no controle da concentração dessa substância, como acontece em algumas plantas (BIRKE *et al.*, 2012).

Os microrganismos apresentados ainda possuem genes de resistência ao mercúrio e arsênio, podendo ajudar a proteger a esponja contra seus efeitos adversos, ao transformar essas substâncias em formas menos tóxicas. A exposição aos metais pesados pode causar alterações na fisiologia e comportamento de organismos, chegando a ser letal (SELVIN *et al.*, 2010). A poluição por metais pesados também pode provocar modificações na comunidade microbiana que comprometem a saúde da esponja (WEBSTER e TAYLOR, 2012).

#### 6.3.5. Patogenia

Nem todas as relações entre esponjas e seus simbiontes são benéficas ao hospedeiro. A maioria das doenças causadas às esponjas foi genericamente atribuída a bactérias e fungos ou não há certeza com relação ao patógeno. Por exemplo, a abundância maior de bactérias dos filos Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Bacteroidetes está associada a esponjas doentes (WEBSTER e TAYLOR, 2012; YANG; ZHANG; FRANCO, 2019). Entretanto, há alguns casos em que o agente causador e o mecanismo de ação foram identificados, como da cepa bacteriana NW4327 de *Pseudoalteromonas agarivorans* que afeta a estrutura da esponja *Rhopaloeides odorabile* por meio de uma colagenase (MUKHERJEE; WEBSTER; LLEWELLYN, 2009).

Nos MAGs, foi verificado o potencial produtivo de possíveis fatores de patogenia, incluindo toxinas, enzimas e outros compostos danosos. Entre eles, inclui-se: (1) o fluoracetato, composto fluorado, produzido por plantas e bactérias com o intuito de defender contra animais, principalmente os herbívoros (LEONG *et al.*, 2017); (2) a hialuronidase, um grupo de enzimas, produzido por bacteriófagos, microrganismos e animais, que degrada o ácido hialurônico, um constituinte do tecido conjuntivo de animais (HYNES e WALTON, 2000); e (3) a hemolisina, uma exotoxina, produzida por bactérias, capaz de romper a membrana levando à lise celular, especialmente em eritrócitos, além de conseguir modular vias apoptóticas (GOEBEL; CHAKRABORTY; KREFT, 1988; CHEN *et al.*, 2018). Contudo, não há registros na literatura científica desses compostos sendo prejudiciais às esponjas. O fluoracetato afeta diversos animais, como aves e mamíferos, mas organismos aquáticos, incluindo plantas, invertebrados e peixes, são altamente resistentes (EASON *et al.*, 2011). Os dois outros compostos estão envolvidos em doenças humanas, mas não há relatos de impactos aos invertebrados (CHEN *et al.*, 2018; HYNES e WALTON, 2000). Por outro lado, a hialuronidase pode estar envolvida na nutrição do simbiote, permitindo-o que se alimente da matriz extracelular da esponja (PITA *et al.*, 2018).

## 6.4. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA

### 6.4.1. Ciclos biogeoquímicos

As esponjas são importantes agentes biogeoquímicos devido ao consumo de organismos e matéria orgânica dissolvida na água, e à degradação e liberação de nutrientes consumidos por outros seres (COLMAN, 2015). Em ambientes marinhos oligotróficos, por exemplo, elas liberam compostos nitrogenados em quantidades significativas, o que facilita o crescimento de produtores primários (PITA *et al.*, 2018). Elas também hospedam microrganismos que participam de etapas da ciclagem de nutrientes como nitrogênio e fósforo (PITA *et al.*, 2018).

No oceano, o nitrogênio, um dos elementos essenciais para ecossistemas e organismos, tem um papel importante na limitação da atividade de organismos marinhos e na entrada de dióxidos no oceano (PAJARES e RAMOS, 2019). Nos MAGs, foram encontrados genes relacionados aos processos de: (1) amonificação, etapa de conversão de substâncias nitrogenadas em amônia, feita por meio da DNRA; (2) nitrificação, processo de oxidação de amônia em nitrito ou hidroxilamina, realizado por bactérias conversoras de amônia (AOB); (3)

interconversão entre nitrato e nitrito, que consiste na transformação do nitrato em nitrito, e vice-versa; e (4) incorporação da amônia em aminoácidos como a glutamina (STEIN e KLOTZ, 2016). A execução de reações do ciclo do nitrogênio, realizadas inteiramente por microrganismos de diferentes grupos taxonômicos, foi relatada anteriormente em bactérias associadas às esponjas (TAYLOR *et al.*, 2007; PAJARES e RAMOS, 2019). Bactérias nitrificantes e AOBs, além de microrganismos envolvidos em outros processos, entre eles a fixação do nitrogênio, desnitrificação, annamox e DNRA, já foram encontradas em diversas espécies de esponjas e em diferentes ambientes, incluindo zonas oceânicas superficiais e abissais (PAJARES e RAMOS, 2019; MOHAMED *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2007).

O ciclo do enxofre tem grande influência na química do oceano, atuando na mineralização de matéria orgânica e interage com os ciclos de outros elementos, como o ferro e manganês (JØRGENSEN; FINDLAY; PELLERIN, 2019). Dentre os processos desse ciclo, foi possível verificar a provável execução pelos MAGs de: (1) assimilação do sulfato, em que o sulfato é reduzido até sulfeto de hidrogênio, podendo ser incorporado em compostos orgânicos; (2) dissimilação de sulfato, permitindo obter energia através da respiração anaeróbica com o sulfato como aceptor final de elétrons; e (3) desproporcionamento do tiosulfato, convertendo-o em outros tiocompostos (KUSHKEVYCH *et al.*, 2020). Contudo, essa a última reação pode ter um fim distinto, pois ela é mediada pela enzima rodanase. A rodanase atua na proteção contra o cianeto de hidrogênio, substância tóxica que inibe enzimas, ao converter o tiosulfato e cianeto de hidrogênio em sulfito e tiocianato, uma forma menos tóxica do cianeto (CIPOLLONE *et al.*, 2007). Apesar disso, nos genomas analisados, há prováveis bactérias redutoras de sulfato (SRB), tipo de microrganismo comumente encontrado em associação com animais, sendo visto em várias espécies de esponjas (JENSEN *et al.*, 2017; LAVY *et al.*, 2018).

Com relação ao fósforo, elemento que compõe o material genético, fosfolipídeos e outros compostos, tanto as esponjas como sua microbiota atuam diretamente na sua ciclagem. Enquanto as esponjas liberam fósforo inorgânico na forma de fosfato, os microrganismos associados são capazes de sequestrar e armazenar o fósforo, influenciando a disponibilidade desse elemento em ambientes de elevada biomassa de esponjas (PITA *et al.*, 2018). Os simbiontes armazenam o fósforo na forma de grânulos de polifosfato, sintetizados pela ação da enzima polifosfato quinase, proteína que compõe o ciclo do polifosfato e está presente em certos MAGs (ZHANG *et al.*, 2015). No oceano, a disponibilidade de fósforo é importante para o

metabolismo dos microrganismos marinhos e para a composição da comunidade microbiana marinha (DYHRMAN; AMMERMAN; MOOY, 2015). Além disso, alguns dos genomas montados possuem enzimas envolvidas na degradação de fosfonatos, compostos orgânicos fosforados utilizados na indústria química e agrícola e que servem como fonte de fósforo e carbono (MCGRATH; TERNAN; QUINN, 1997). Dessa forma, eles possivelmente atuam na remineralização do fósforo, processo de transformação do composto orgânico fosforado em inorgânico. O metabolismo de fosfonatos pode ser encontrado tanto em microrganismos marinhos de vida livre como no microbioma de animais invertebrados, incluindo esponjas e corais (VILLARREAL-CHIU; QUINN; MCGRATH, 2012; PODELL *et al.*, 2020). No meio ambiente, os fosfonatos são bastante recalcitrantes, resistindo à degradação química e física e provavelmente contribuem para a biodisponibilidade de fósforo no mar em condições anóxicas (PAYTAN e MCLAUGHLIN, 2007).

#### **6.4.2. Relações ecológicas**

Além das participações na ciclagem de nutrientes, a associação entre esponjas e seu microbioma gera outras repercussões na comunidade e no ecossistema onde habitam. Os holobiontes de esponjas participam da ciclagem de matéria orgânica dissolvida através, tanto do seu consumo pelo hospedeiro e os simbiossiontes, como pela sua conversão em partículas orgânicas, tornando o alimento mais facilmente acessível para a fauna do recife. Por serem heterotróficos e conseguirem degradar compostos orgânicos complexos, os MAGs potencialmente realizam esses dois processos, sendo que o último pode ajudar ainda na retenção e reciclagem de nutrientes dentro do recife e facilitar a transferência de energia (KIRAN *et al.*, 2018; PITA *et al.*, 2018).

Os MAGs também possivelmente produzem metabólitos biologicamente ativos envolvidos no bloqueio de predadores, como compostos antivirais, antimicrobianos e citotóxicos, influenciando na susceptibilidade do hospedeiro à predação e na interação da esponja com outros organismos da comunidade (PITA *et al.*, 2018). Vale ressaltar que foi vista a presença de genes ligados à via de biossíntese do dimetilsulfureto e dimetilsulfoniopropionato, compostos que contribuem para a regulação do clima, além de agir na proteção contra o dano oxidativo e predadores (TAYLOR *et al.*, 2007).



### 6.4.3. Biorremediação

Na biorremediação microbiana, tira-se proveito do metabolismo inerente de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos para quebrar, modificar ou acumular contaminantes orgânicos e inorgânicos, podendo até utilizá-los como precursor de metabólitos secundários e fonte de energia e nutrientes (ABATENH *et al.*, 2017; OLINGER *et al.*, 2021). Biorreatores microbianos são aplicados para remediação em diversas situações, incluindo tratamento do esgoto, tratamento de solos e no controle da poluição do ar (TEKERE, 2019).

As esponjas funcionam não apenas como bioindicadores de poluição, mas também como agentes de biorremediação. Esponjas acumulam contaminantes, entre eles metais, compostos orgânicos sintéticos e microplásticos, em seus tecidos (GIRARD *et al.*, 2021). Além disso, a presença de poluentes acarreta uma alteração no microbioma de esponjas, afetando a abundância e diversidade da comunidade microbiana (TURON *et al.*, 2019). Por outro lado, esponjas hospedam microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos halogenados que podem persistir na natureza e serem danosos ao meio ambiente (OLINGER *et al.*, 2021).

Nos MAGs, foram encontradas enzimas relacionadas à degradação dos compostos orgânicos da **Tabela 15**. Dos contaminantes possivelmente degradados, nenhum deles afeta especificamente as esponjas, sendo que o éter difenílico polibromado pode ser produzido por algumas espécies de esponjas e seus simbiontes (AGARWAL *et al.*, 2017). Contudo, alguns desses poluentes, como certos tipos de éter difenílico polibromado, naftaleno e glifosato, são sabidamente poluentes orgânicos que persistem no oceano, podendo afetar outros organismos aquáticos, como algas, corais e moluscos (IPEN, 2018; VAGI; PETSAS; KOSTOPOULOU, 2021).

**Tabela 15.** Genes para enzimas ligadas à degradação de contaminantes encontrados nos MAGs, além de informações sobre a poluição causada e alguns de seus efeitos.

Contaminante	Enzima de degradação	Local de contaminação	Aplicação de origem	Efeitos danosos	Referências
Naftaleno	Naftaleno 1,2-dioxigenase	Ar, águas e seres vivos	Síntese de compostos	Carcinogénico	(JIA e BATTERMAN, 2010)
4-Cloronitrobenzeno	2-Amino-5-cloromuconato desaminase	Águas e solos	Síntese de compostos clorados e nitrogenados	Lesões a tecidos e órgãos de mamíferos	(ARORA e BAE, 2014)
1,2-Dicloroetano	Haloalcano dealogenase	Ar e águas	Síntese de compostos Solvente industrial	Carcinogénico	(ZAAAN <i>et al.</i> , 2009) (NAGANO <i>et al.</i> , 2006)
Haletos orgânicos	2-Haloacrilato redutase	Ar, águas, solos e seres vivos	Agrotóxico Síntese de compostos	Carcinogénico	(HE, <i>et al.</i> , 2021) (KURATA <i>et al.</i> , 2003)
Fluoroacetato	Fluoroacetato dealogenase	Águas doces e salgadas	Pesticida Síntese de compostos fluorados	Tóxico aos mamíferos	(ALEXANDRINO <i>et al.</i> , 2018) (GONCHAROV, JENKINS, RADLOV, 2005)
Éter difenílico bromado	Difenil 2,3-dioxigenase	Ar, águas, solos e seres vivos	Retardante de chamas	Carcinogénico Tóxico aos mamíferos	(YAO <i>et al.</i> , 2020) (ZHAO <i>et al.</i> , 2017)
2,4-D	2,4-diclorofenol 6-monoxigenase	Águas	Herbicida	Tóxico a plantas e animais	(MARCATO e SOUZA, 2017)
MPCA	2,4-diclorofenol 6-monoxigenase	Águas e solos	Herbicida	Tóxico a plantas e animais	(MOR TON <i>et al.</i> , 2019)

Os MAGs possuem também a capacidade de degradar produtos intermediários de vias biorremediadoras. Um deles é o 4-sulfocatechol, composto intermediário da quebra de sulfonatos, tipo de composto que apresenta várias funções, sendo usados como corante, detergente e dispersante (HALAK *et al.*, 2007). Outro é o 4-hidroxiacetofenona, intermediário da degradação de substâncias como inseticidas e retardantes de chamas (MOONEN *et al.*, 2008).

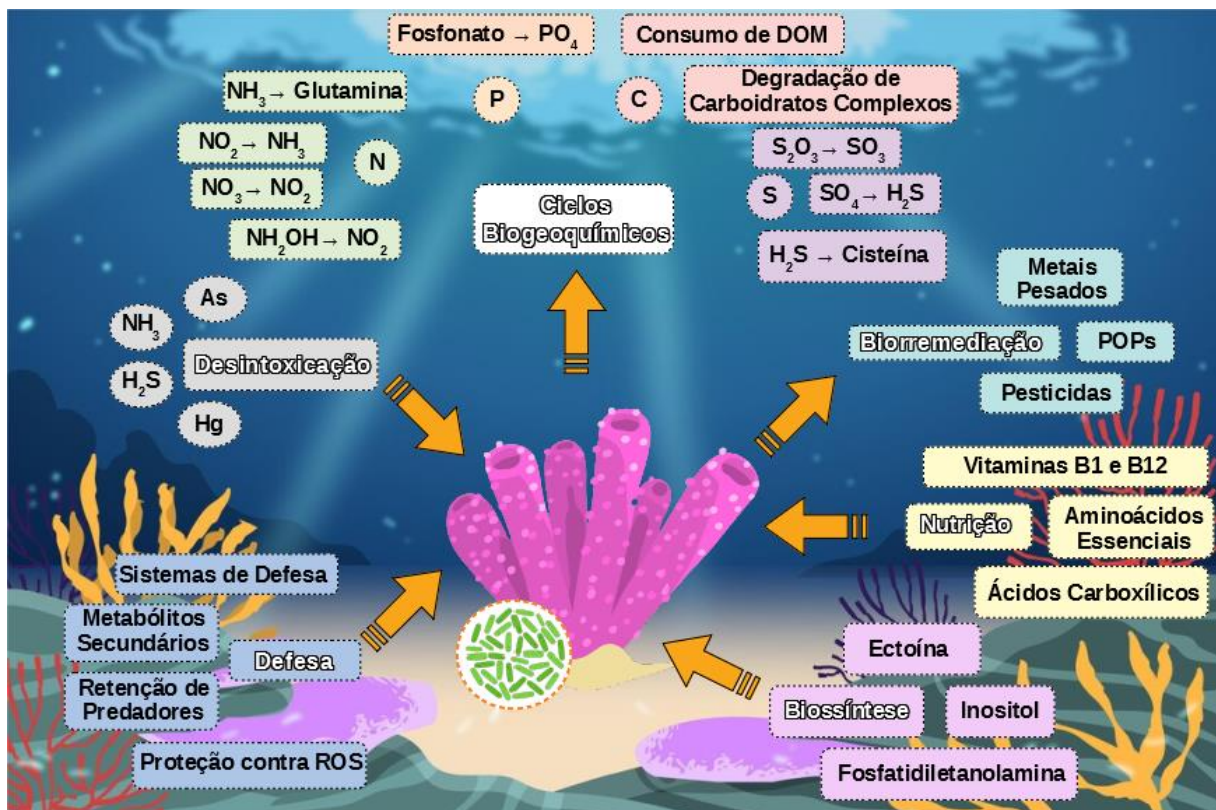
Além de matéria orgânica, há a possível biorremediação de metais pesados. Os metais pesados, advindos de fontes naturais ou de atividades humanas, são uma causa relevante de poluição em águas e solos. Diversos grupos de bactérias atuam na biorremediação desses elementos, conseguindo transformar alguns deles (TAREKEGN; SALILIH; ISHETU, 2020).

O mercúrio é um metal altamente tóxico presente naturalmente na forma elemental ou como mineral, podendo ser encontrado em águas e solos poluídos por fontes humanas distintas, como ligas metálicas, agrotóxicos, baterias e lâmpadas (ESSA *et al.*, 2002). Esse elemento induz a perda de função de proteínas afetando principalmente o aminoácido cisteína (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). Vários MAGs apresentam o gene para a enzima mercúrio redutase que confere resistência de espectro estreito, ou seja, executa a degradação apenas de sais de mercúrio e alguns compostos orgânicos de mercúrio (ESSA *et al.*, 2002). O uso de microrganismos resistentes ao mercúrio na biorremediação tem sido o foco de vários estudos, incluindo na criação de um biorreator para tratamento de águas residuais vindas do processo de cloro-álcali e na remediação *in situ* de solos e sedimentos contaminados com mercúrio (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003).

Já o arsênio, presente nas formas de arsenito e arsenato, é um elemento tóxico bastante abundante que pode ser encontrado em solos, águas e alimentos graças às atividades antrópicas de mineração e metalurgia e ao uso de agrotóxicos (ROSEN, 2002; BROWN *et al.*, 2018). Os microrganismos estudados apresentam dois mecanismos para lidar com as altas concentrações de arsênio: (1) a redução do arsenato em arsenito pela ação da arsenato redutase, permitindo a expulsão do arsênio da célula; e (2) a transformação, realizada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do arsênio inorgânico em um composto orgânico que é posteriormente retirado com um transportador (CHEN *et al.*, 2016; BROWN *et al.*, 2018). Microrganismos que atuam no metabolismo do arsênio podem ser usados no tratamento de águas contaminadas. O tratamento pode ser feito através da remoção do arsênio por meio de sua adsorção ou da oxidação do arsenito, reação ausente nos MAGs, que facilita a eliminação do arsênio por tecnologias tradicionais (CAVALCA *et al.*, 2013)

Por fim, há várias outras enzimas, nos genomas analisados, que podem ser aplicadas na biorremediação de ambientes. Monoxigenases e dioxigenases, além de serem empregadas nas indústrias química e farmacêutica, catalisam a incorporação de átomos de oxigênio em um substrato, podendo ser aplicadas na degradação ou transformação de compostos aromáticos e outros hidrocarbonetos (KARIGAR e RAO, 2011). Outras proteínas que podem ser usadas na biorremediação são a nitrila hidratase, liase capaz de converter nitrila em amido, empregada no tratamento de esgoto com o objetivo de remover compostos nitrilados das águas residuais; e a dealogenase, que participa da transformação de compostos orgânicos halogenados (CHENG; XIA; ZHOU, 2020; OYEWUSI; WAHAB; HUYOP, 2020). Além do mais, lipases podem ser usadas na remoção de óleos e lipídeos de águas residuais e esterases atuam na degradação de piretroides, compostos tóxicos utilizados no controle de insetos (JOSEPH; RAMETEKE; THOMAS, 2008; WEI, 2013).

A **Figura 17** resume os principais processos ecológicos dos quais as bactérias analisadas potencialmente participam.



**Figura 17.** Todas as possíveis contribuições dos MAGs para a esponja e o ecossistema onde habita.

## 6.5. INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

### 6.5.1. Metabólitos secundários

As esponjas e seus microrganismos associados são uma fonte rica de compostos biologicamente ativos, sendo capazes de produzir metabólitos secundários de diferentes classes que apresentam propriedades relevantes do ponto de vista ecológico e biotecnológico (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; BIBI *et al.*, 2017). Tais metabólitos podem ser gerados por uma ação isolada do hospedeiro ou do simbiote, por um processo de síntese compartilhada, em que o produto da via de um deles serve como substrato na via do outro, ou por uma atuação integrada dos dois com a combinação de vias biossintéticas, culminando num composto inédito (SELVIN *et al.*, 2010). As principais utilidades desses compostos estão relacionadas à defesa química das esponjas, evasão de predadores e melhoria do desempenho fisiológico (PITA *et al.*, 2018).

Os MAGs podem estar envolvidos na produção de determinados metabólitos secundários que possuem aplicação biotecnológica. Um deles é a tetraidrocurcumina, uma molécula com grande potencial terapêutico, apresentando propriedades anti-inflamatória e antioxidante que podem ser exploradas no tratamento de doenças como câncer (ZHANG *et al.*, 2018b; LAI; HO; PAN, 2020). Embora não haja relatos de degradação da curcumina no microbioma de esponjas, tal reação já foi descrita em simbioses do sistema digestório de humanos (HASSANINASAB *et al.*, 2011). Foram identificados ainda genes ligados à síntese da goma xantana, polissacarídeo usado na indústria alimentícia como espessante, emulsionante e estabilizante (HONORATO *et al.*, 2013).

Além disso, dois compostos já citados possuem, além da função biológica, utilidade biotecnológica. O osmólito ectoína tem inúmeras aplicações cosméticas, médicas e biotecnológicas. Dois exemplos são a aplicação como produto de cuidado da pele e potencial medicamento contra Alzheimer (BECKER *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021). Já o mio-inositol é utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Entre as possíveis aplicações, inclui-se o uso como aditivo em bebidas, no tratamento da diabetes e esteatose hepática, e na geração do ácido urônico e outros derivados do inositol (YOU *et al.*, 2020).

Há ainda, em alguns MAGs, a possível produção de ácidos biliares. Os ácidos biliares são o produto final do metabolismo do colesterol, cuja função principal é solubilizar e transportar lipídeos (LI *et al.*, 2009). Em seres humanos, os ácidos biliares auxiliam na

eliminação de colesteróis do organismo, emulsificação de vitaminas lipossolúveis facilitando sua absorção, e contribuem na motilidade e redução da flora intestinal (PIL; WON; SHIN, 2016). Entretanto, esponjas não produzem líquidos que auxiliam na digestão e os ácidos biliares não são encontrados com muita frequência nesses organismos (CANO *et al.*, 2013). Essas substâncias podem apresentar propriedades biológicas ativas como atividade anti-inflamatória e citotóxica (LI *et al.*, 2009). O isolamento de ácidos biliares a partir de culturas não é comum, mas algumas bactérias halotolerantes são capazes de produzi-los, sendo constatada essa síntese também em um fungo do gênero *Penicillium* (LI *et al.*, 2009; PIL; WON; SHIN, 2016).

Cabe ressaltar que, com programa antiSMASH, foi possível identificar diversos *clusters* de genes envolvidos na geração de diferentes metabólitos secundários, incluindo terpenos, rantipeptídeos, LAPs, T1PKS e proteínas similares à NRPS, além de encontrar proteínas com o elemento de reconhecimento de RiPPs (RRE), domínio conservado capaz de interagir com o peptídeo, possibilitando a identificação de novos compostos (BURKHART *et al.*, 2015). Com exceção dos rantipeptídeos cuja função permanece desconhecida, os metabólitos encontrados podem apresentar vários tipos de atividades que podem ser exploradas biotecnologicamente. Os terpenos, por exemplo, podem ser usados como repelente, pigmento, flavorizante e aromatizante, além de compor medicamentos para infecções e doenças cardiovasculares (SCHEMPP *et al.*, 2017; COX-GEORGIAN *et al.*, 2018). Fármacos, como o imunossupressor ciclosporina, o antimicrobiano penicilina, e o antitumoral bleomicina, são peptídeos não ribossomais (IACOVELLI; BOVENBERG; DRIESSEN, 2021). Alguns LAPs deram origem a antibióticos, entre eles a microcina B, plantazolicina e goadsporina (METELEV e GHILAROV, 2014). Já os policetídeos compõem diversos medicamentos, desde antibióticos e antiparasitários, até antitumorais, imunossupressores e agentes antiolesterolêmicos (NIVINA *et al.*, 2019). Foram encontrados também *clusters* para outros RiPPs inespecíficos.

O ambiente marinho é uma fonte relevante de alguns dos metabólitos secundários detectados com o antiSMASH, havendo relatos de sua possível produção em microrganismos marinhos. Por exemplo, já foi relatada a produção de bacteriocinas por microrganismos advindos do ambiente marinho, em diferentes espécies e locais, inclusive em bactérias associadas a animais (DESRIAC *et al.*, 2010). A bacteriocina, um tipo de RiPP, apresenta aplicação na indústria de alimentos como conservante e probiótico, além de poder ser usado no tratamento de infecções e câncer (YANG *et al.*, 2014). Os simbiontes de esponjas são ainda uma fonte relevante de NRPS e PKS (PIMENTEL-ELARDO *et al.*, 2012; TRINDADE-SILVA *et al.*, 2013).

Finalmente, foram registrados genes ligados à produção de antibióticos. A microbiota das esponjas é uma fonte rica para antibióticos, com bactérias de diferentes filos, especialmente Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes, capazes de produzir uma série de compostos antimicrobianos contra protozoários, fungos, bactérias e vírus, alguns deles inéditos (INDRANINGRAT; SMIDT; SIPKEMA, 2016). Embora não tenha sido encontrada nenhuma via completa de biossíntese de antibióticos, os MAGs podem participar da produção dos antimicrobianos da **Tabela 11**.

### 6.5.2. Enzimas de relevância biotecnológica

Além da possível produção de metabólitos secundários, foi verificada a presença de genes que codificam enzimas de interesse biotecnológico. Enzimas microbianas fazem parte de diversos processos biotecnológicos, industriais e farmacêuticos, e possuem inúmeras aplicações comerciais e industriais em várias áreas, havendo uma demanda crescente por esses biocatalizadores (ADRIO e DEMAINE, 2014; BERINI *et al.*, 2017). Métodos independentes de cultivo, especialmente a metagenômica, possibilitaram a identificação de novas enzimas derivadas de microrganismos não cultiváveis (BERINI *et al.*, 2017). Entre os vários locais onde pode ser feita a prospecção de enzimas, o microbioma de esponjas é um local de interesse, existindo até exemplos de enzimas comerciais, como quitinases, lacases e lipases, obtidas a partir de microrganismos associados (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Dentre as várias enzimas aplicadas industrial e comercialmente, foram identificadas as enzimas que constam na **Tabela 13**. Nessa tabela há também informações sobre a área de aplicação e as funções desempenhadas em cada área.

Além das enzimas citadas acima, outras enzimas detectadas durante a reconstrução metabólica possuem aplicação biotecnológica. Por exemplo, a enzima superóxido dismutase, que faz parte da via de degradação de ROS, apresenta atividade anti-inflamatória, sendo usada no tratamento de câncer de mama, esclerose múltipla e outras doenças (VACHHER *et al.*, 2021). Já a 2-haloacrilato redutase, enzima que participa da biorremediação de certos agrotóxicos, está envolvida na produção de substâncias precursoras de herbicidas (KURATA *et al.*, 2008). Ainda foi encontrado em um dos MAGs o sistema CRISPR-Cas9, um instrumento utilizado na biologia molecular para edição genômica (SONG *et al.*, 2016).

Também foi verificada, nos MAGs, a presença de cinco classes de CAZymes: glicosil hidrolases (GH), polissacarídeo liase (PL), glicosiltransferase (GT), carboidrato esterase (CE)

e módulo de ligação a carboidrato (CBM). As enzimas ativas em carboidratos (CAZyme) são um grupo de enzimas que realiza a construção ou quebra de carboidratos complexos e outros glicoconjugados. Essas enzimas, além da ação em carboidratos, podem ter outros domínios, incluindo domínio de interação proteica, e unidades formadas por outras enzimas como proteases e fosfatases (CANTAREL *et al.*, 2009). As CAZymes são empregadas em diversos setores, entre eles a bioenergia e as indústrias alimentícia e química, usadas principalmente na produção de compostos bioativos derivados de oligossacarídeos. (CONTESINI.; FRANDBSEN; DAMASIO, 2021). Várias enzimas desse grupo, especialmente GHs e CEs, que foram identificadas, isoladas e caracterizadas, derivam de microrganismos associados a organismos marinhos e apresentam propriedades únicas (BAYER *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

### **6.5.3. Peptídeos biologicamente ativos**

Organismos marinhos, como as esponjas e seus microrganismos associados, também são uma fonte promissora de BAPs, grupo de peptídeos, na maioria das vezes com menos de 50 resíduos de aminoácidos, que possui alguma função biológica (MACEDO *et al.*, 2021; AKBARIAN *et al.*, 2022). Os peptídeos bioativos apresentam diversos tipos de atividades diferentes, incluindo antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, anticoagulante e analgésica (MACEDO *et al.*, 2021). Eles ainda têm um grande potencial farmacêutico e nutracêutico, já havendo a comercialização de alguns produtos peptídicos de origem marinha (MACEDO *et al.*, 2021). Três exemplos de BAPs obtidos a partir de esponjas são a discobahamina A-B, polidiscamida A e faquelistatina, que possuem, respectivamente, ação antifúngica, antibacteriana e anticâncer (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; AKBARIAN *et al.*, 2022). Os MAGs apresentaram grande potencial para geração de peptídeos, sendo predita a presença de BAPs em todos eles com possíveis funções antimicrobiana, antifúngica, anticâncer e anti-inflamatória.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As bactérias do filo candidato Latescibacterota, recuperados do microbioma de esponjas do Recife Amazonas, contêm diversos genes dos quais o hospedeiro pode tirar proveito e dos quais é possível explorar biotecnologicamente.

Do ponto de vista ecológico, há vários benefícios possíveis que as bactérias estudadas podem trazer à esponja. Elas podem auxiliar na nutrição do hospedeiro pelo fornecimento de substâncias essenciais ou pela síntese de compostos que a esponja pode utilizar. Os MAGs também possuem genes envolvidos na proteção do hospedeiro. Tais benefícios podem ajudar a elucidar como a esponja é capaz de prosperar no seu habitat e mostram um pouco da importância dos simbioses para o sucesso desses organismos.

Em nível de ecossistema, há potencial participação nos ciclos do carbono, do nitrogênio, do enxofre e do fósforo, além da biorremediação de metais pesados e compostos orgânicos. Dessa forma, os microrganismos em estudo possivelmente contribuem na disponibilidade de nutrientes e na proteção contra poluentes no Recife Amazonas.

Do ponto de vista biotecnológico, os MAGs possuem sequências que codificam enzimas de interesse a diferentes indústrias, além de possuírem genes envolvidos na produção de metabólitos secundários que podem ser aplicados em vários setores. Ainda foram preditos vários peptídeos biologicamente ativos com uma variedade de atividades que podem ser aproveitadas. Assim, os MAGs analisados são uma fonte rica de genes envolvidos na geração de bioprodutos, podendo ser futuramente explorados comercial e industrialmente.

A partir dos resultados obtidos, será possível futuramente descobrir, sintetizar, testar e aplicar novos compostos que possam ter alguma utilidade biotecnológica. É possível selecionar sequências e moléculas potencialmente produzidas para serem analisadas com maior profundidade com o intuito de determinar a existência de alguma utilidade biotecnológica. Uma triagem dos compostos mais promissores poderia ser feita pela análise da sua estrutura molecular. Após a triagem, pode-se proceder à expressão heteróloga de sequências de maior potencial, em busca de sintetizar, isolar e purificar o bioproduto para posterior confirmação da atividade predita e aplicação da mesma.



## 8. REFERÊNCIAS

ABATENH, E. et al. The Role of Microorganisms in Bioremediation - A Review. **Open Journal of Environmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 38 – 46, Novembro 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17352/OJEB.000007>.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117 – 139, Março 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.

AGARWAL, V. et al. Metagenomic discovery of polybrominated diphenyl ether biosynthesis by marine sponges. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 5, p. 537 – 543, Março 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2330>.

AGRAWAL, P. et al. AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 1 – 12, Maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa153>.

AGRAWAL, P. et al. *In Silico* Approach for Prediction of Antifungal Peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 323, p. 1 – 13, Fevereiro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00323>.

AKBARIAN, M. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1445, p. 1 – 30, Janeiro 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>.

ALEXANDRINO, D. A. et al. Biodegradation of mono-, di- and trifluoroacetate by microbial cultures with different origins. **New Biotechnology**, v. 43, p. 23 – 29, Julho 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.005>.

ALVES, L. de F. et al. Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science. **International Journal of Genomics**, v. 2018, n. 2312987, p. 1 – 15, Agosto 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/2312987>.

ANANTHARAMAN, K. et al. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. **Nature Communications**, v. 7, n. 13219, p. 1 – 11, Outubro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms13219>.

ARAÚJO, F. V. et al. Ecology and biotechnological potential of bacterial community from three marine sponges of the coast of Rio de Janeiro, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2785 – 2792. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170462>.

ARKIN, A. P. et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566 – 569, Julho 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.

ARORA, P. K.; BAE, H. Toxicity and Microbial Degradation of Nitrobenzene, Monochloronitrobenzenes, Polynitrobenzenes, and Pentachloronitrobenzene. **Journal of Chemistry**, v. 2014, n. 265140, p. 1 – 12, Dezembro 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/265140>.

BAGARINAO, T.U. Sulfide as an environmental factor an toxicant: tolerance and adaptations in a aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 24, n. 1 – 2, p. 21 – 62, Novembro 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90015-F](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90015-F).

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 355 – 384, Junho 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00046-9).

BASHIR, Y.; SINGH, S. P.; KONWAR, B. K. Metagenomics: An Application Based Perspective. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, n. 146030, p. 1 – 7, Agosto 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/146030>.

BAYER, K. et al. Marine Sponges as *Chloroflexi* Hot Spots: Genomic Insights and High-Resolution Visualization of an Abundant and Diverse Symbiotic Clade. **mSystems**, v. 3, n. 6, p. 1 – 19, Dezembro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00150-18>.

BECKER, J.; WITTMANN, C. Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 65, p. 118 – 128, Outubro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.010>.

BELMOK, A. et al. Long-Term Effects of Periodical Fires on Archaeal Communities from Brazilian Cerrado Soils. **Archaea**, v. 2019, n. 6957210, p. 1 – 11, Janeiro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/6957210>.

BERINI, F. et al. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. **FEMS Microbiol Letters**, v. 364, n. 21, Novembro 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx211>.

BIBI, F. et al. Bacteria from marine sponges: A source of new drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 1, p. 11 – 15, Janeiro 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389200217666161013090610>.

BIRKE, H. Cysteine biosynthesis, in concert with a novel mechanism, contributes to sulfide detoxification in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Journal**, v. 445, n. 2, p. 275 – 283, Junho 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20120038>.

BLIN, K. et al. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. 29 – 35, Julho 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>.

BORNEMANN, T. L. et al. uBin – a manual refining tool for metagenomic bins designed for educational purposes. **bioRxiv**, p. 1 – 21, Julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.204776>.

BOWERS, R. M. et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 725 – 731, Agosto 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3893>.

BRAMHACHARI, P. V. et al. Novel Insights on the Symbiotic Interactions of Marine Sponge-Associated Microorganisms: Marine Microbial Biotechnology Perspective. In: PALLELA, R.; EHRLICH, H. (Ed.) **Marine Sponges: Chemicobiological and Biomedical Applications**. New Delhi: Springer, 2016, cap. 6, p. 69 – 95. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2794-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2794-6_6).

BRINKMANN, C. M.; MARKER, A.; KURTBOKE, D. I. An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexhausted Sources for Natural Product Discovery. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 1 – 32, Setembro 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d9040040>.

BROWN, E. et al. Mechanisms of bacterial degradation of arsenic. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 4, p. 136 – 441, Dezembro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18231/2394-5478.2018.0090>.

BURGS DORF, I. et al. Lineage-specific energy and carbon metabolism of sponge symbionts and contributions to the host carbon pool. **The ISME Journal**, v. 16, p. 1163 – 1775, Janeiro 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01165-9>.

BURKHART, B. J. et al. A Prevalent Peptide-Binding Domain Guides Ribosomal Natural Product Biosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 8, p. 564 – 570, Agosto 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1856>.

CABELLO-YEVES, P. J. et al. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. **Limnology and Oceanography**, v. 65, n. 7, p. 1471 – 1488, Julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lno.11401>.

CANO, L. P. P. et al. Isolation of acetylated bile acids from the sponge *Siphonochalina fortis* and DNA damage evaluation by the comet assay. **Steroids**, v. 78, n. 10, p. 982 – 986, Outubro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.05.020>.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233 – 238, Janeiro 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 1, p. 445 – 453, Janeiro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>.

CAVALCA, L. et al. Microbial transformations of arsenic: perspectives for biological removal of arsenic from water. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 753 – 768, Junho 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.38>.

CHAUMEIL, P. et al. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1925 – 1927, Março 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>.

CHEN, J. et al. Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 945 – 953, Junho 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.13371>.

CHEN, S. et al. Dysregulated hemolysin liberates bacterial outer membrane vesicles for cytosolic lipopolysaccharide sensing. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 8, p. 1 – 23, Agosto 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007240>.

CHENG, Z.; XIA, Y.; ZHOU, Z. Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 352, Abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00352>.

CHUN, J. et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, Janeiro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>.

CIPOLLONE, R. et al. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese in Protection from Cyanide Toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 390 – 398, Janeiro 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02143-06>.

COLMAN, A. S. Sponge symbionts and the marine P cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 14, p. 4191 – 4192, Abril 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1502763112>.

CONTESINI, F. J.; FRANDBSEN, R. J. N.; DAMASIO, A. CAZymes in Biorefinery: From Genes to Application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. 622817, p. 1 – 3, Fevereiro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622817>.

COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. In: JOSHEE, N.; DHEKNEY, S. A.; PARAJULI, P. (Ed.). **Medicinal Plants**. Cham: Springer, 2019, cap. 15, p. 333 – 359. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15).

DAVIS, J. J. et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 1, p. 606 – 612, Janeiro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz943>.

DESRIAC, F. et al. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1153 – 1177, Abril 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md8041153>.

DIAS, R. S. et al. Metagenomics: Library construction and screening methods. In: BENEDETTI, C. (Ed.). **Metagenomics: Methods, Applications and Perspectives**. Reino Unido: Nova Science Publishers, 2014, cap. 2, p. 45 – 66.

DIEZ-VIVES, C. et al. Expression of eukaryotic-like protein in the microbiome of sponges. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 5, p. 1432 – 1451, Março 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mec.14003>.

DRULA, E. et al. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 571 – 577, Janeiro 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.

DYHRMAN, S. T.; AMMERMAN, J. W.; MOOY, B. A. V. Microbes and the Marine Phosphorus Cycle. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 110 – 116, Outubro 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.54>.

EASON, C. T. et al. An updated review of the toxicology and ecotoxicology of sodium fluoroacetate (1080) in relation to its use as a pest control tool in New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1 – 20, Janeiro 2011. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24060627>.

EMBREE, M. et al. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 50, p. 15450 – 15455, Dezembro 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1506034112>.

ENGELBERTS, J. P. et al. Characterization of a sponge microbiome using an integrative genome-centric approach. **The ISME Journal**, v. 14, n. 5, p. 1100 – 1110, Janeiro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0591-9>.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; LEON, A. V. de; SANCHEZ-FLORES, A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics.

**Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 348, p. 1 – 15, Dezembro 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>.

ESSA, A. M. M.; MACASKIE, L. E.; BROWN, N. L. Mechanisms of mercury bioremediation. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 4, p. 672 – 674, Agosto 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bst0300672>.

FENG, G.; LI, Z. Carbon and Nitrogen Metabolism of Sponge Microbiome. In: LI, Z (Ed.) **Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2019, v. 1, cap. 9, p. 145 – 169. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_9).

FLOREA, L. et al. Genome Assembly Has a Major Impact on Gene Content: A Comparison of Annotation in Two *Bos Taurus* Assemblies. **PLOS One**, v. 6, n. 6, p. 1 – 10, Junho 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021400>.

FRANCINI-FILHO, R. B. et al. Perspectives on the Great Amazon Reef: Extension, Biodiversity, and Threats. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, n. 142, p. 1 – 5, Abril 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00142>.

FRANK, A. C. Molecular host mimicry and manipulation in bacterial symbionts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 4, p. 1 – 19, Fevereiro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz038>.

FREDERICO, T. D. et al. Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain PE591, a Polyethylene-Degrading Bacterium Isolated from Savanna Soil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 32, p. 1 – 3, Agosto 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mra.00490-21>.

GENIN, E. et al. New trends in phospholipid class composition of marine sponges. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 4, p. 427 – 431, Agosto 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.012>.

GIRARD, E. B. et al. Sponges as bioindicators for microparticulate pollutants? **Environmental Pollution**, v. 268, n. 115851, p. 1 – 35, Janeiro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115851>.

GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T.; KREFT, J. Bacterial Hemolysins As Virulence Factors. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 54, n. 5, p. 453 – 463, Setembro 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00461864>.

GONCHAROV, N. V.; JENKINS, R. O.; RADILOV, A. S. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 148 – 161, Abril 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1118>.

GREENING, C. et al. Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H<sub>2</sub> is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. **The ISME Journal**, v. 10, p. 761 – 777, Março 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.153>.

GUPTA, S. et al. *In Silico* Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLOS One**, v. 8, n. 9, p. 1 – 10, Setembro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>.

HALAK, S. et al. 4-Sulfomuconolactone Hydrolases from *Hydrogenophaga intermedia* S1 and *Agrobacterium radiobacter* S2. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6998 – 7006, Outubro 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00611-07>.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669 – 685, Dezembro 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>.

HASSANINASAB, A. et al. Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 16, p. 6615 – 6620, Abril 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1016217108>.

HE, H. et al. Environmental occurrence and remediation of emerging organohalides: A review. **Environmental Pollution**, v. 290, n. 118060, p. 1 – 16, Dezembro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118060>.

HENTSCHEL, U. et al. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 641 – 654, Julho 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2839>.

HENTSCHEL, U.; USHER, K. M.; TAYLOR, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, n. 2, p. 167 – 177, Fevereiro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x>.

HERMANN, L. et al. The ups and downs of ectoine: structural enzymology of a major microbial stress protectant and versatile nutrient. **Biological Chemistry**, v. 401, n. 12, p. 1443 – 1468, Agosto 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0223>.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 1 – 11, Dezembro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.18378/rvads.v8i5.1950>.

HORN, H. et al. An Enrichment of CRISPR and Other Defense-Related Features in Marine Sponge-Associated Microbial Metagenomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1751, p. 1 – 15, Novembro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01751>.

HYNES, W. L.; WALTON, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 2, p. 201 – 207, Fevereiro 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x>.

IACOVELLI, R.; BOVENBERG, R. A. L.; DRIESSEN, A. J. M. Nonribosomal peptide synthetases and their biotechnological potential in *Penicillium rubens*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 1 – 30, Julho 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab045>.

INDRANINGRAT, A. A. G.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 87, p. 1 – 66, Maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md14050087>.

IPEN. **Ocean Pollutants Guide: Toxic Threats to Human Health and Marine Life**. [S.l.], 2018. Disponível em: <https://fundingtheocean.org/reports/ocean-pollutants-guide-toxic-threats-to-human-health-and-marine-life/>.

ISTVAN, P. et al. Structural and functional characterization of a novel lipolytic enzyme from a Brazilian Cerrado soil metagenomic library. **Biotechnology Letters**, v. 40, p. 1395 – 1406. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2598-0>.

JENSEN, S. et al. The Relative Abundance and Transcriptional Activity of Marine Sponge-Associated Microorganisms Emphasizing Groups Involved in Sulfur Cycle. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 3, p. 668 – 676, Abril 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0836-3>.

JESKE, L. et al. BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 542 – 549, Janeiro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1048>.

JIA, C.; BATTERMAN, S. A Critical Review of Naphthalene Sources and Exposures Relevant to Indoor and Outdoor Air. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2903 – 2939, Julho 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph7072903>.

JORGENSEN, B. B.; FINDLAY, A. J.; PELLERIN, A. The Biogeochemical Sulfur Cycle of Marine Sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 849, Abril 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457 – 470, Setembro 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.003>.



KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 353 – 361, Janeiro 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>.

KANEHISA, M.; SATO, Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. **Tools for Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 29 – 35, Agosto 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3711>.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 726 – 731, Fevereiro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 805187, Setembro 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/805187>.

KARP, P. D. et al. Pathway Tools version 23.0 update: software for pathway/genome informatics and systems biology. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 109 – 126, Janeiro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbz104>.

KIRAN, G. S. et al. Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. **Marine Environmental Research**, v. 140, p. 169 – 179, Setembro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.017>.

KURATA, A. et al. Production of (S)-2-chloropropionate by asymmetric reduction of 2-chloroacrylate with 2-haloacrylate reductase coupled with glucose dehydrogenase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 429 – 331, Abril 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.105.429>.

KUSHKEVYCH, I. et al. Recent Advances in Metabolic Pathways of Sulfate Reduction in Intestinal Bacteria. **Cells**, v. 9, n. 3, Março 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9030698>.

LAI, C.; HO, C.; PAN, M. The Cancer Chemopreventive and Therapeutic Potential of Tetrahydrocurcumin. **Biomolecules**, v. 10, n. 831, p. 1 – 26, Maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10060831>.

LANNES, R. et al. Carbon Fixation by Marine Ultrasmall Prokaryotes. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 4, p. 1166 – 1177, Abril 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gbe/evz050>.

LAPORT, M. S. et al. Antibiotic resistance genes detected in the marine sponge *Petromica citrina* from Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 617 – 620, Julho 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.016>.

LATA, S.; MISHRA, N. K.; RAGHAVA, G. P. AntiBP2: improved version of antibacterial peptide prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 19, p. 1 – 7, Janeiro 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-S1-S19>.

LAVY, A. et al. A novel Chromatiales bacterium is a potential sulfide oxidizer in multiple orders of marine sponges. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 800 – 814, Fevereiro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14013>.

LEONG, L. E. X. et al. Fluoroacetate in plants - a review of its distribution, toxicity to livestock and microbial detoxification. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 55, p. 1 – 11, Junho 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0180-6>.

LI, H. et al. Bile Acid Derivatives from a Sponge-Associated Bacterium *Psychrobacter sp.* **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 6, p. 857 – 862, Junho 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1607-1>.

LI, Z. et al. Metabolic profiles of prokaryotic and eukaryotic communities in deep-sea sponge *Neamphius huxleyi* indicated by metagenomics. **Scientific Reports**, v. 4, n. 3895, Janeiro 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep03895>.

LIU, M. et al. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 76, p. 1 – 11, Março 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>.

MACEDO, M. W. F. S. et al. Marine Organisms as a Rich Source of Biologically Active Peptides. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, n. 667764, p. 1 – 23, Julho 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.667764>.

MAHIQUES, M. M. de et al. Insights on the evolution of the living Great Amazon Reef System, equatorial West Atlantic. **Scientific Reports**, v. 9, n. 13699, p. 1 – 8, Setembro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50245-6>.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 8, p. 4360 – 4377, Abril 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>.

MANCHANDA, N. et al. GenomeQC: a quality assessment tool for genome assemblies and gene structure annotations. **BMC Genomics**, v. 21, n. 193, Março 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6568-2>.

MARCATO, A. C. de C.; SOUZA, C. P. de; FONTANETTI, C. S. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 120, p. 1 – 12, Março 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 2, p. 327 – 331, Julho 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh454>.

MCGRATH, J.; TERNAN, N.; QUINN, J. Utilization of organophosphonates by environmental micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 69 – 73, Janeiro 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00350.x>.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 60, p. 1 – 14, Fevereiro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.

METELEV, M. V.; GHILAROV, D. A. Structure, Function, and Biosynthesis of Thiazole/Oxazole Modified Microcins. **Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 29 – 45, Fevereiro 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026893314010105>.

MOHAMED, N. M. et al. Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. **The ISME Journal**, v. 4, p. 38 – 48, Janeiro 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.84>.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella* species). **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 393 – 396, Março 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1997.tb00003.x>.

MONDINO, S.; SCHMIDT, S.; BUCHRIESER C. Molecular Mimicry: a Paradigm of Host-Microbe Coevolution Illustrated by Legionella. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1201 – 1220, Outubro 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01201-20>.

MOONEN, M. J. H. et al. Elucidation of the 4-Hydroxyacetophenone Catabolic Pathway in *Pseudomonas fluorescens* ACB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5190 – 5198, Agosto 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.01944-07>.

MOONEY, C. et al. Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. **PLOS One**, v. 7, n. 10, p. 1 – 12, Outubro 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045012>.

MORENO-PINO, M. et al. Characterizing the microbiomes of Antarctic sponges: a functional metagenomic approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. 645, p. 1 – 12, Janeiro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57464-2>.

MORTON, P. A. et al. A review of the pesticide MCPA in the land-water environment and emerging research needs. **WIREs Water**, v. 7, n. 1, p. 1 – 16, Dezembro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wat2.1402>.

MOURA, R. L. et al. An extensive reef system at the Amazon River mouth. **Science Advances**, v. 2, n. 4, p. 1 – 11, Abril 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501252>.

MUKHERJEE, J.; WEBSTER, N.; LLEWELLYN, L. E. Purification and Characterization of a Collagenolytic Enzyme from a Pathogen of the Great Barrier Reef Sponge, *Rhopaloeides odorabile*. **PLOS One**, v. 4, n. 9, p. 1 – 5, Setembro 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007177>.

MURZYN, K.; ROG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 2, p. 1091 – 1103, Fevereiro 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048835>.

NAGANO, K. et al. Carcinogenicity and Chronic Toxicity in Rats and Mice Exposed by Inhalation to 1,2-Dichloroethane for Two Years. **Journal of Occupational Health**, v. 48, n. 6, p. 424 – 436, Novembro 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1539/joh.48.424>.

NAKASHIMA, Y. et al. Metagenomic Analysis of the Sponge *Discodermia* Reveals the Production of the Cyanobacterial Natural Product Kasumigamide by ‘Entotheonella’. **PLOS One**, v. 11, n. 10, p. 1 – 15, Outubro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164468>.

NIVINA, A. et al. Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 24, p. 12524 – 12547, Dezembro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00525>.

NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824 – 834, Maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>.

OLINGER, L. K. et al. Sponges With Microbial Symbionts Transform Dissolved Organic Matter and Take Up Organohalides. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, n. 665789, p. 1 – 13, Maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.665789>.

OLIVEIRA, B. F. R. de et al. Harnessing the sponge microbiome for industrial biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 19, p. 8131 – 8154, Outubro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10817-3>.

OLM, M. R. et al. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2864 – 2868, Julho 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.126>.

ONDOV, B. D. et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. **Genome Biology**, v. 17, n. 132, p. 1 – 14, Junho 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>.

OSINGA, R. et al. Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. **Hydrobiologia**, v. 461, p. 55 – 62, Outubro 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1012717200362>.

OYEWUSI, H. A.; WAHAB, R. A.; HUYOP, F. Dehalogenase-producing halophiles and their potential role in bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, n. 111603, Novembro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111603>.

PACE, N. R. et al. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In: MARSHALL, K. (Ed.). **Advances in Microbial Ecology**. Boston, MA: Springer, 1986. v. 9, cap. 1, p. 1 – 55. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1).

PAJARES, S.; RAMOS, R. Processes and Microorganisms Involved in the Marine Nitrogen Cycle: Knowledge and Gaps. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, n. 739, Novembro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>.

PALLELA R.; KIM, S. Ecobiotechnology of Marine Sponges and Their Symbionts - Review and Present Status. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 15 – 25, Dezembro 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.15433/KSMB.2011.5.4.015>.

PARKS, D. H. et al. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1079 – 1086, Abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0501-8>.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043 – 1055, Maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.

PAUL, V. J.; FREEMAN, C. J.; AGARWAL, V. Chemical Ecology of Marine Sponges: New Opportunities through “-Omics”. **Integrative and Comparative Biology**, v. 59, n. 4, p. 765 – 776, Outubro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/icb/icz014>.

PAYTAN, A.; MCLAUGHLIN, K. The Oceanic Phosphorus Cycle. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 2, p. 563 – 576, Janeiro 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr0503613>.

PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **Journal of Immunotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 163 – 174, Setembro 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>.

PÉREZ-COBAS, A. E.; GOMEZ-VALERO, L.; BUCHRIESER, C. Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 8, p. 1 – 22, Julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>.

PIL, G. B.; WON, H. S.; SHIN, H. J. Bile acids from a Marine Sponge-Associated Fungus *Penicillium sp.* **Journal of the Korean Magnetic Resonance Society**, v. 20, n. 2, p. 41 – 45, Junho 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.6564/JKMRS.2016.20.2.041>.

PIMENTEL-ELARDO, S. M. et al. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetase Genes in the Microbial Metagenomes of Marine Sponges. **Marine Drugs**, v. 10, n. 6, p. 1192 – 1202, Junho 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md10061192>.

PINTO, O. H. B. et al. Plume Layer Influences the Amazon Reef Sponge Microbiome Primary Producers. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 867234, p. 1 – 11, Maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.867234>.

PITA, L. et al. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. **Microbiome**, v. 6, n. 46, Março 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0428-1>.

PODELL, S. et al. A genomic view of trophic and metabolic diversity in clade-specific *Lamellodysidea* sponge microbiomes. **Microbiome**, v. 8, n. 97, p. 1 – 17, Junho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00877-y>.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590 – 596, Janeiro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.

RAMAPRASAD, A. S. E. et al. AntiAngioPred: A Server for Prediction of Anti-Angiogenic Peptides. **PLOS One**, v. 10, n. 9, p. 1 – 13, Setembro 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136990>.

REGOLI, F. et al. Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. **Marine Biology**, v. 137, p. 453 – 461, Outubro 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002270000369>.

RENARD, E. et al. Porifera (Sponges): Recent Knowledge and New Perspectives. **eLS**, p. 1 – 8, Dezembro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029283>.

REYNOLDS, D.; THOMAS, T. Evolution and function of eukaryotic-like proteins from sponge symbionts. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 20, p. 5242 – 5253, Outubro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mec.13812>.

REYNOLDS, T. B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1386 – 1396, Maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.025718-0>.

RICHTER, M. et al. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929 – 931, Março 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>.

ROBB, F. T.; TECHTMANN, S. M. Life on the fringe: microbial adaptation to growth on carbon monoxide. **F1000Research**, v. 7, n. 1981, p. 1 – 10, Dezembro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.16059.1>.

ROBBINS, S. J. et al. A genomic view of the reef-building coral *Porites lutea* and its microbial symbionts. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2090 – 2100, Setembro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0532-4>.

ROBBINS, S. J. et al. A genomic view of the microbiome of coral reef demosponges. **The ISME Journal**, v. 15, n. 6, p. 1641 – 1654, Janeiro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00876-9>.

ROBERTS, M. F. Inositol in Bacteria and Archaea. In: MAJUMDER, A.; BISWAS, B. (Ed.). **Biology of Inositols and Phosphoinositides**. Boston, MA: Springer, 2006. (Subcellular Biochemistry, v. 39), cap. 5, p. 103 – 133. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/0-387-27600-9\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-27600-9_5).

ROCHA, E. P. C.; BIKARD, D. Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? **PLOS Biology**, v. 20, n. 1, p. 1 – 18, Janeiro 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001514>.

ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86 – 92, Outubro 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03186-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03186-1).

SANTOS, D. F. K. Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 73, p. 479 – 491, Outubro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0866-x>.

SANTOS-GANDELMAN, J. F. et al. Biotechnological Potential of Sponge-Associated Bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 143 – 155, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389201015666140711115033>.

SCHEMPP, F. M. et al. Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 10, p. 2247 – 2258, Março 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00473>.

SCHIPPERS, K. J. et al. Cultivation of Sponges, Sponge Cells and Symbionts: Achievements and Future Prospects. **Advances in Marine Biology**, v. 62, p. 273 – 237, Junho 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00006-0>.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068 – 2069, Julho 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

SELVIN, J. et al. Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. **Microbiological Research**, v. 164, n. 3, p. 352 – 363, Junho 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.05.005>.

SELVIN, J. et al. Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 82 – 90, Janeiro 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408410903397340>.

SILVA, M. R. S. S. et al. Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management. **Acta Oecologica**, v. 100, n. 103463, p. 1 – 10, Outubro 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.103463>.

SILVEIRA, R. et al. Seasonal and long-term effects of nutrient additions and liming on the nifH gene in cerrado soils under native vegetation. **iScience**, v. 24, n. 4, p. 1 – 12, Março 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102349>.

SLABY, B. M. et al. Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. **The ISME Journal**, v. 11, p. 2465 – 2478, Julho 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.101>.

SONG, G. et al. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. **The Crop Journal**, v. 4, n. 2, p. 75 – 82, Abril 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.12.002>.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312 – 1313, Maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 94 – 98, Fevereiro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>.



STOREY, M. A. et al. Metagenomic Exploration of the Marine Sponge *Mycale hentscheli* Uncovers Multiple Polyketide-Producing Bacterial Symbionts. **mBio**, v. 11, n. 2, p. 1 – 16, Março 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.02997-19>.

TAREKEGN, M. M.; SALILIH, F. Z.; ISHETU, A. I. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1 – 19, Junho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1783174>.

TAYLOR, M. W. et al. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 295 – 347, Junho 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00040-06>.

TEKERE, M. Microbial Bioremediation and Different Bioreactors Designs Applied. In: LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q. (Ed.). **Biotechnology and Bioengineering**. IntechOpen, 2019. cap. 9. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83661>.

THACKER, R. W.; FREEMAN, C. J. Sponge–Microbe Symbioses: Recent Advances and New Directions. **Advances in Marine Biology**, v. 62, p. 57 – 111, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00002-3>.

THOMAS, T. et al. Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. **The ISME Journal**, v. 4, p. 1557 – 1567, Dezembro 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.74>.

TORONEN, P.; MEDLAR, A.; HOLM, L. PANNZER2: a rapid functional annotation web server. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 84 – 88, Julho 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky350>.

TRAN, P. Q. et al. Depth-discrete metagenomics reveals the roles of microbes in biogeochemical cycling in the tropical freshwater Lake Tanganyika. **The ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 1971 – 1986, Julho 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00898-x>.

TRINDADE-SILVA, A. E. et al. Taxonomic and Functional Microbial Signatures of the Endemic Marine Sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PLOS One**, v. 7, n. 7, p. 1 – 10, Julho 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039905>.

TRINDADE-SILVA, A. E. et al. Polyketide Synthase Gene Diversity within the Microbiome of the Sponge *Arenosclera brasiliensis*, Endemic to the Southern Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1598 – 1605, Março 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.03354-12>.

TSOI, R. et al. Metabolic division of labor in microbial systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 10, p. 2526 – 2531, Março 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1716888115>.

TURON, M. et al. Sponges and Their Microbiomes Show Similar Community Metrics Across Impacted and Well-Preserved Reefs. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1961, p. 1 – 13, Agosto 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01961>.

UNTERHOLZNER, S. J.; POPPENBERGER, B.; ROZHON, W. Toxin–antitoxin systems: Biology, identification, and application. **Mobile Genetic Elements**, v. 3, n. 5, p. 1 – 13, Setembro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mge.26219>.

VACHHER, M. et al. Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals. **Current Research in Biotechnology**, v. 3, p. 195 – 208, Maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.05.006>.

VAGI, M. C.; PETSAS, A. S.; KOSTOPOULOU, M. N. Potential Effects of Persistent Organic Contaminants on Marine Biota: A Review on Recent Research. **Water**, v. 13, n. 2488, p. 1 – 35, Setembro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w13182488>.

VAVOURAKIS, C. D. et al. A metagenomics roadmap to the uncultured genome diversity in hypersaline soda lake sediments. **Microbiome**, v. 6, n. 168, p. 1 – 18, Setembro 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0548-7>.

VERSLUIS, D. et al. Sponge Microbiota Are a Reservoir of Functional Antibiotic Resistance Genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1846, p. 1 – 13, Novembro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01848>.

VIEITES, J. M. et al. Metagenomics approaches in systems microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2009, p. 236 – 255, Dezembro 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00152.x>.

VIGNAIS, P.; COLBEAU, A. Molecular Biology of Microbial Hydrogenases. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 159 – 188, Maio 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.21775/cimb.006.159>.

VILLARREAL-CHIU, J. F.; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 19, p. 1 – 13, Janeiro 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00019>.

VILLESEN, P. FaBox: an online toolbox for FASTA sequences. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 6, p. 965 – 968, Maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>.

WAGHU, F. H. et al. CAMP<sub>R3</sub>: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 1094 – 1097, Janeiro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 545, Julho 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0123-2>.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 335 – 346, Fevereiro 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x>.

WEBSTER, N. S.; THOMAS, T. The Sponge Hologenome. **mBio**, v. 7, n. 2, p. 335 – 346, Abril 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-16>.

WEI, T. et al. Characterization of a novel thermophilic pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase from *Sulfolobus tokodaii* into a new family. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 255 – 232, Dezembro 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.022>.

WU, Y.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 605 – 607, Fevereiro 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>.

YANG, C. et al. A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 6301 – 6314, Novembro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.028>.

YANG, S. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 241, p. 1 – 10, Dezembro 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>.

YANG, Q.; ZHANG, W.; FRANCO, C. M. M. Response of Sponge Microbiomes to Environmental Variations. In: LI, Z. (Ed.). **Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2019, v. 1, cap. 11, p. 181 – 247. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_11).

YAO, B. et al. Current progress in degradation and removal methods of polybrominated diphenyl ethers from water and soil: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. 123674, p. 1 – 16, Fevereiro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123674>.

YOU, R. et al. Efficient production of myo-inositol in *Escherichia coli* through metabolic engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 109, p. 1 – 10, Maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01366-5>.

ZAAN, B. et al. Degradation of 1,2-dichloroethane by microbial communities from river sediment at various redox conditions. **Water Research**, v. 43, n. 13, p. 3207 – 3216, Julho 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.042>.

ZHANG, F. et al. Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 14, p. 4381 – 4386, Abril 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1423768112>.

ZHANG, H. et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 95 – 101, Julho 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>.

ZHANG, L. et al. Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 766364, p. 1 – 15, Dezembro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>.

ZHANG, Z. et al. Curcumin's Metabolites, Tetrahydrocurcumin and Octahydrocurcumin, Possess Superior Anti-inflammatory Effects *in vivo* Through Suppression of TAK1-NF- $\kappa$ B Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1181, p. 1 – 12, Outubro 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01181>.

ZHAO, C. et al. Biodegradation of polybrominated diphenyl ethers and strategies for acceleration: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 23 – 32, Abril 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.12.010>.

## 9. APÊNDICE

## Produção científica durante o Mestrado



# Plume Layer Influences the Amazon Reef Sponge Microbiome Primary Producers

Otávio H. B. Pinto<sup>1</sup>, Till L. V. Bornemann<sup>2</sup>, Rafael S. Oliveira<sup>1</sup>, Tayna D. Frederico<sup>1</sup>, Betania F. Quirino<sup>3</sup>, Alexander J. Probst<sup>2,4</sup>, Mayanne A. M. de Freitas<sup>5</sup>, Fabiano L. Thompson<sup>5</sup> and Ricardo H. Kruger<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Enzymology, Institute of Biological Sciences, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Aquatic Microbial Ecology, Environmental Microbiology and Biotechnology, Department of Chemistry, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, <sup>3</sup>Genetics and Biotechnology Laboratory, Embrapa-Agroenergia, Brasília, Brazil, <sup>4</sup>Centre of Water and Environmental Research (ZWI), University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, <sup>5</sup>Department of Genetics, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

## Edited by:

Sébastien Duperron,  
Muséum National d'Histoire Naturelle,  
France

## Reviewed by:

Cara Fiore,  
Appalachian State University,  
United States  
Marie-Charlotte Cheutin,  
Université de Montpellier,  
CNRS, France

## \*Correspondence:

Ricardo H. Kruger  
kruger@unb.br

## Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Symbioses,  
a section of the journal  
Frontiers in Marine Science

Received: 31 January 2022

Accepted: 13 April 2022

Published: 19 May 2022

## Citation:

Pinto OHB, Bornemann TLV,  
Oliveira RS, Frederico TD,  
Quirino BF, Probst AJ,  
de Freitas MAM, Thompson FL  
and Kruger RH (2022) Plume Layer  
Influences the Amazon Reef Sponge  
Microbiome Primary Producers.  
Front. Mar. Sci. 9:867234.  
doi: 10.3389/fmars.2022.867234

Symbiont relationships between corals and photosynthetic microorganisms sustain coral reef existence. However, the Great Amazon Reef System (GARS) stays under a plume layer that attenuates the entry of light, and instead of corals, sponges are the major reef epifauna, for which little is known about the function of the associated microbiome. Here, we used genome-resolved metagenomics to investigate how the sponge microbiome supports its host and overcomes the reduced light availability, recovering 205 MAGs from *Agelas* and *Geodia* sponges with completeness >70% and contamination <10%. Beta diversity estimates based on the 16S rRNA genes indicated the microbiomes of Amazon and Caribbean sponges to be distinct ( $P < 0.01$ ), with heterotrophic lifestyles being prevalent in Amazon sponge microbiomes ( $P < 0.05$ ). Nevertheless, genes indicating the carbon fixation pathways 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate cycle, 3-Hydroxypropionate bicycle, Reductive Tricarboxylic Acid Cycle, and Calvin-Benson-Bassham cycle could be recovered in low abundance. The presence of Cyanobacteria, represented by both 16S rRNA analyses and low-quality MAGs indicated light incidence on the reef. The metabolic profile shows that the GARS sponge microbiome had genes for sulfate reduction, sulfur oxidation, nitric oxide reduction, ammonia oxidation, nitrate reduction, nitrite ammonification, nitrite oxidation, and nitrite reduction, indicating that the microbiome might play a role in detoxification of the holobiont. We conclude, that neither the plume-limited photosynthesis of the sponge microbiome nor the primary producers sustain the organic carbon input for the sponges, which likely live off plume-associated organic carbon and their heterotrophic microbiota.

**Keywords:** Carbon fixation, Host-associated, Metagenome-assembled genomes (MAGs), Sponge microbiome, the Great Amazon Reef System (GARS)