



**ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA MICROBIOTA PRESENTE
NO SEDIMENTO MARINHO DA PRAIA DE LUCENA-PB ATRAVÉS DA ABORDAGEM
METAGENÔMICA E CULTIVO CONVENCIONAL**

RENATA VALENÇA VAZ

Recife

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA MICROBIOTA PRESENTE NO
SEDIMENTO MARINHO DA PRAIA DE LUCENA-PB ATRAVÉS DA ABORDAGEM
METAGENÔMICA E CULTIVO CONVENCIONAL

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.
Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho.
Co-orientadora: Vânia Maria Maciel Melo.

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V393a

Valença Vaz, Renata

ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA MICROBIOTA PRESENTE NO
SEDIMENTO MARINHO DA PRAIA DE LUCENA-PB ATRAVÉS DA ABORDAGEM METAGENÔMICA E
CULTIVO CONVENCIONAL / Renata Valença Vaz. - 2021.

135 f. : il.

Orientador: Jose Vitor Moreira Lima Filho.

Coorientador: Vania Maria Maciel Melo.

Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.

1. Microbiota Marinha. 2. Shotgun. 3. 16S rRNA. 4. Metabólitos Secundários. 5. Taxonomia. I. Filho, Jose Vitor
Moreira Lima, orient. II. Melo, Vania Maria Maciel, coorient. III. Título

Dedico essa tese a minha maior e mais importante força; minha mãe, Andréa Valença.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa concedida.

Ao programa de pós-graduação RENORBIO. A todos e, em especial, a Sandra Morgado.

Ao meu orientador, prof. Vítor Filho, por esses dez anos de convivência sempre pautada na confiança, respeito e parceria. Por ter me ensinado tanto e sempre de forma generosa. Por ser exigente e sempre tentar extrair o que temos de melhor. Agradeço também pelo conselheiro e amigo nos momentos mais complicados dessa jornada. Finalizamos o ciclo de orientador/orientada, mas com a certeza de que vamos nos encontrar nos carnavais e bares da vida! Obrigada.

Aos colegas do Lamim. Da antiga e nova geração. Todos contribuíram de alguma forma e foram importantes para a minha construção profissional e pessoal. Pessoas importantes que já cumpriram seus trabalhos, como Jacqueline Ellen, Danielle Nascimento e Roberta Ventura. E os que estavam mais próximos a mim no período do doutorado, como Lucas Nunes, Ingrydt Alcântara e Betty Mancebo. Agradeço especialmente à Lethicia Tavares pelo fundamental apoio nessa etapa.

À minha co-orientadora, Vânia Melo, por ter me acolhido no período em que estive em Fortaleza. Nesse período fundamental para minha jornada, a tomei como exemplo e inspiração e pude conviver em um ambiente de muita aprendizagem e afeto. Muito obrigada! Agradeço a todos que fazem parte do Lembiotech.

Agradeço também ao apoio de Flávia Figueira e SÍntia Almeida pela contribuição com as análises de bioinformática.

“ Mas o que salva a humanidade é que não há quem cure a curiosidade”

Tom zé

RESUMO

Bactérias marinhas podem representar uma importante fonte de compostos bioativos antimicrobianos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a abundância taxonômica, funcional, quantificar os genes de resistência a antibióticos (ARGs), e, também, cultivar cepas bacterianas produtoras de policetídeo a partir de amostras de sedimento marinho. As expedições foram realizadas na Praia de Lucena, localizada na região metropolitana de João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil. A draga Van Veen foi usada para coleta de amostras de sedimento marinho (n = 21) na profundidade de 10 metros de dezembro / 2016 a setembro / 2017. A extração do DNA metagenômico foi realizada com 0,25 gramas de cada amostra. Os primers SC-Act-235-aS-20 e S-CAct-878-aA19 foram usados para amplificar as regiões entre V3 a V5 do gene 16S rRNA por PCR e, em seguida, foi realizada a construção da biblioteca 16S rRNA. As análises de dados após o sequenciamento foram realizadas usando a plataforma One Codex. O sequenciamento shotgun foi analisado através do q2-plugin de diversidade em QIIME2 a uma profundidade de amostragem de 6.060. Sequenciamento de DNA foi montados em metagenomas e confrontados com diferentes bancos de dados. Uma amostra de sedimento marinho foi selecionada para cultura bacteriana em laboratório. A espectrometria de massa de cromatografia gasosa foi usada para identificação de compostos da classe dos policetídeos. Os resultados mostraram maior abundância dos filos Actinobacteria, Planctomycetes e Proteobacteria nas amostras, incluindo gêneros de bactérias associados à produção de bioativos, tais como: Nocardioideis, Streptomyces, Blastopirellula e, Myxococcus. Análises in silico revelaram genes envolvidos em duas vias de metabolismo no gênero Streptomyces: 1) terpenóides, policetídeos e carotenóides; e 2) outros metabólitos secundários, incluindo estilbeno. Além disso, encontramos 179 genes resistentes a antibióticos associados a 17 classes de antibióticos de outras bactérias em sedimentos marinhos. Quatro produtores de policetídeo *Pseudomonas* spp. foram identificados. Os espectros de massa obtidos a partir de extratos fermentados levaram à identificação de um precursor metabólico policetídeo: ácido orselínico; e quatro compostos químicos da classe dos policetídeos: 4-terc-butilfenol, ácido triacético lactona, 5,7-Dihidroxi-2-etilcromona, Filoquinona. Concluímos que o o sedimento marinho da praia de Lucena PB, pode abrigar Actinobactérias do gênero Streptomyces responsáveis pela síntese de novos antimicrobianos e que cepas de *Pseudomonas* marinhas podem representar uma fonte rica de policetídeos de interesse farmacêutico. Contudo, atenção deve ser dada às bactérias marinhas que carregam genes de resistência a antibióticos para medicamentos restritos ao hospital.

ABSTRACT

Marine bacteria may represent an important source of bioactive compounds and antimicrobials. The objective of this work was to prospect microorganisms from the marine sediment using the 16S rRNA gene as a phylogenetic marker, and to cultivate polyketide-producing bacterial strains. Expeditions were conducted at Praia de Lucena, located in the metropolitan region of João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. A Van Veen dredge was used for collection of samples of marine sediment ($n = 21$) at depth of 10 meters from December/ 2016 to September/ 2017. Extraction of metagenomic DNA was carried out with 0.25 grams of each sample. The SC-Act-235-aS-20 and S-CAct-878-aA19 primers were used to amplify the regions between V3 to V5 of the 16S rRNA gene by PCR. After construction of the 16S rRNA library, the data analysis after sequencing was performed using One Codex platform. Shotgun sequencing was carried out through the MiSeq System. Alpha and beta diversity were determined using the q2- diversity plugin in QIIME2 at a sampling depth of 6,060. Paired-end DNA sequencing 34 reads were assembled into metagenomes and compared with different database. One sample of marine sediment was selected for bacterial culture in laboratory. Gas chromatography-mass spectrometry was used for identification of compounds of polyketide class. The results showed greater abundance of the phyla Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria in the samples, including genera of bacteria associated with production of bioactives, such as: Nocardioideis, Streptomyces, Blastopirellula and, Myxococcus. In silico analyses revealed genes involved in two metabolism pathways in the genus Streptomyces: 1) terpenoids, polyketides and carotenoids; and 2) other secondary metabolites, including stilbene. In addition, we found 179 antibiotic-resistant genes associated to 17 antibiotic classes from other bacteria in marine sediment. Four polyketide-producing *Pseudomonas* spp. were identified. The mass spectra obtained from fermented extracts led to identification of a polyketide metabolic precursor: Orselinic acid; and four chemical compounds of the polyketide class: 4-tert-Butylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone, Phylloquinone. We conclude that cultivation of marine Actinobacteria from the genus Streptomyces can lead to production of novel broad-spectrum antimicrobials. However, attention should be paid to marine bacteria that carry antibiotic resistance genes to hospital-restricted drugs and marine *Pseudomonas* strains represent a rich source of polyketides of pharmaceutical interest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação dos cluster gênico, módulos e domínios catalíticos envolvidos na biossíntese da eritromicina.....	28
Figura 2	Pontos de coleta dos sedimentos marinhos.....	35
Figura 3	Abundancia dos Filos bacterianos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro.....	48
Figura 4	Abundancia dos Filos bacterianos no mês de setembro.....	49
Figura 5	Abundancia dos Filos bacterianos nos meses de abril, maio e junho.....	49
Figura 6	Abundancia das classes bacterianos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro.....	50
Figura 7	Abundancia das classes bacterianos no mês de setembro.....	51
Figura 8	Abundancia das classes bacterianas nos meses de abril, maio e junho.....	52
Figura 9	Abundancia dos gêneros bacterianos nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e setembro.....	53
Figura 10	Abundancia dos gêneros bacterianos nos meses de abril, maio e junho.....	54
Figura 11	Categorias funcionais gerais (nível de subsistema 1) para KEGG, COG e eggNOGs.....	59
Figura 12	Gráfico de barras mostrando a caracterização funcional para KEGG, COG e eggNOGs no filo Actinobacteria.....	60
Figura 13	Categorias funcionais para KEGG (nível de subsistema 3) no gênero Streptomyces usando sequenciamento metagenômico.....	60
Figura 14	Classes de antibióticos cujos microrganismos nas amostras possuem genes de resistência a medicamentos.....	61
Figura 15	Cromatogramas de extratos metabólicos de Pseudomonas spp. 1, 2, 6 e 8, respectivamente.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Localização dos pontos de coleta do sedimento marinho na Praia de Lucena/ Paraíba – Brasil.....	36
Tabela 2	Parâmetros ambientais observados na água intersticial presentes na área de coleta das amostras de sedimento marinho.....	37
Tabela 3	Precipitação média observadas no litoral norte do estado da Paraíba – Brasil.....	37
Tabela 4	Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo.....	41
Tabela 5	Taxonômia dos grupos bacterianos identificados a partir da biblioteca metagenômica do gene 16S rRNA gene presentes no sediment marinho.....	56
Tabela 6	Diversidade taxonômica atribuída ao conjunto de dados do shotgun... Sequencias do gene 16S rRNA dos isolados marinhos comparadas às	58
Tabela 7	seqüências da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	63
Tabela 8	Constituintes químicos identificados em extratos metabólicos de Pseudomonas spp.....	65

SUMÁRIO

Introdução	14
Revisão Bibliográfica	16
Compostos bioativos de origem microbiana.....	16
Potencial biotecnológico da microbiota marinha.....	18
Filos bacterianos de importância biotecnológica presentes no ecossistema marinho.....	22
Compostos bioativos: classe dos policetídeos.....	26
Objetivos	32
Metodologia	34
Coleta de sedimentos marinhos.....	34
Análise metagenômica.....	38
Isolamento de bactérias das amostras de sedimento marinho.....	43
Fermentação e extração de metabólitos extracelulares.....	45
Resultados	47
Discussão	66
Conclusão	73
Referência Bibliográfica	74
Artigo 1. Bacterial taxonomic diversity and identification of polyketide-producing <i>Pseudomonas</i> spp. in marine sediment at Northeast Brazilian Coast.....	95
Artigo 2. Screening of Actinobacteria from marine sediment for identification of novel antimicrobials in Northeast Brazilian coast.....	122

INTRODUÇÃO

Os compostos químicos com ação biológica, produzidos naturalmente por microrganismos, são explorados há mais de meio século para a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos. Na década de 1970, por exemplo, foram descobertas as principais classes de antibióticos utilizadas atualmente, por meio do cultivo em laboratório de bactérias e fungos do solo terrestre. Contudo, ao considerarmos que apenas 1% dos microrganismos, presentes nos mais variados ecossistemas, podem ser facilmente cultivados e que as técnicas convencionais limitam o acesso às fontes com características ambientais extremas, nos faz pensar o quanto ainda há para ser explorado em relação os microrganismos ambientais.

Uma das microbiotas ainda pouco elucidadas é a que constitui o ambiente marinho. Nesse ecossistema, que ocupa 70% da superfície da Terra, os principais desafios no estudo microbiológico estão relacionados à reprodutibilidade de sua natureza dinâmica, como a temperatura, salinidade e correntes de água. Para isso, a fim de minimizar as dificuldades inerentes ao ambiente marinho, técnicas que independem do cultivo através da abordagem metagenômica e sequenciamento genético, são ferramentas eficientes para o entendimento da ecologia e evolução dos microrganismos marinhos, para quantificar genes biossintéticos que são responsáveis pela síntese de compostos bioativos e detectar a presença de genes de resistência a antibióticos (ARGs) nos oceanos.

Os esforços para a soma do conhecimento em estudos sobre a microbiota marinha, ao longo dos anos, são importantes do ponto de vista biotecnológico visto que os problemas contemporâneos como surtos infecciosos virais, maior incidência de câncer e aumento das infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos, exigem ações multidisciplinares e investimentos contínuos na descoberta de medicamentos. Na clínica médica e veterinária, os compostos bioativos utilizados atualmente da classe dos policetídeos, terpenoides, fenilpropanoides, carotenoides e estilbenos, por exemplo, são prospectados predominantemente de biomas terrestres. Dessa forma, o conhecimento consolidado sobre a abundância e diversidade dos grupos taxonômicos microbianos em cada habitat do ecossistema marinho, pode auxiliar na prospecção de compostos com alta diversidade estrutural e novas funções bioativas de interesse para saúde pública.

Além dos benefícios biotecnológicos para o desenvolvimento de fármacos, sobretudo antibióticos, o estudo do microbioma marinho também pode auxiliar no entendimento sobre a distribuição geográfica natural dos ARGs. Embora o ambiente hospitalar seja um dos principais reservatórios de microrganismo resistentes antibióticos, o ambiente natural (solo, rios e mares), não deve ser subestimado como um potencial reservatório e, nesses locais, o impacto que a disseminação dessas linhagens resistentes pode representar à saúde pública ainda é pouco compreendido.

Portanto, nosso objetivo com esse trabalho foi utilizar a abordagem metagenômica para explorar o sedimento marinho, coletados no litoral do nordeste brasileiro, quanto ao seu perfil taxonômico e funcional. E, além disso, prospectar microrganismos potencialmente envolvidos na síntese compostos bioativos da classe dos policetídeos que compõem a estrutura química de importantes fármacos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Compostos bioativos de origem microbiana

Desde a descoberta da penicilina em 1929, por Alexander Fleming, foi possível observar que determinados micro-organismos presentes no solo eram capazes de sintetizar compostos químicos com ação antibiótica. Esses compostos, em geral, derivam do metabolismo secundários de fungos e bactérias, apresentam natureza química diversificada e não estão envolvidos nas vias metabólicas do crescimento, desenvolvimento e reprodução. Porém, embora não influenciem diretamente no ciclo de vida, alguns metabólitos secundários são capazes de inibir o crescimento (efeito citostático) ou matar (efeito citotóxico) micro-organismos e, desta forma, podem conferir vantagens competitivas de sobrevivência à célula microbiana produtora (Phelan et al 2013).

Visto a importância e o impacto que esses compostos trariam ao tratamento de doenças infecciosas, entre as décadas de 40 e 70, foram investidos grandes esforços no cultivo de micro-organismos em laboratório (Crofts et al 2017). Logo, na década de 60, as principais classes de antibióticos utilizadas atualmente já haviam sido descobertas (Bérdy 2005). Dentre os táxons restritos de bactérias e fungos capazes de produzir compostos com ação biológica, os principais são as bactérias filamentosas do grupo do actinomicetos. Membro desse grupo, a espécie *Streptomyces* sp., é responsável pela produção de 80% dos compostos descobertos até então (Dinesh et al 2017).

Além disso, os avanços nas pesquisas acerca dos metabólitos secundários de microrganismos, demonstraram que tais compostos não teriam somente o potencial em combater infecções bacterianas. A partir do ano de 2000, por exemplo, houve um aumento exponencial no número descritos de compostos bioativos e mais de 22.000 metabólitos secundários foram publicados na literatura científica e de patentes (Bérdy 2005).

As outras importantes aplicações na clínica médica dos compostos bioativos estão voltadas ao desenvolvimento de drogas antivirais (Li et al 2019) e drogas anticâncer (Romero et al 1997, Erba et al 1999,

Jin et al 2019). Na pecuária e agricultura, os compostos bioativos podem ser utilizados como promotores de crescimento na produção animal (Manyi-Loh et al 2018), e no biocontrole de patógenos em plantações (Law et al 2017). Na área ambiental, estudos descrevem o potencial biotecnológico dos metabólitos secundários microbianos na biorremediação de áreas costeiras atingidas por derramamentos de óleo (Saeki et al., 2009, Wang et al., 2014).

Embora o cultivo em laboratório de microrganismos isolados do solo terrestre tenha sido bem-sucedida inicialmente, logo as indústrias biotecnológica e farmacêutica constataram que cultivar e rastrear táxons microbianos, apenas nesse tipo de ecossistema, resultava no isolamento de compostos bioativos repetidos e já conhecidos. O custo benefício dessa estratégia foi, então, questionado e as principais indústrias investiram menos esforços na prospecção de novos produtos naturais de origem microbiana (Jensen et al 2013).

Sobre os antibióticos, desde o final da década de 90, vinte medicamentos foram aprovados pelos órgãos Food and Drug Administration (FDA) e European Medicines Agency (EMA). Porém, dentre esses, apenas dois antibióticos apresentavam novas moléculas. Os demais são originados de moléculas pré-existentes, modificadas através da química combinatória para produzir novos medicamentos (Duval et al 2019). Alguns fatores influenciam para que haja diminuição na prospecção de novos compostos. Um deles é o tempo entre a descoberta e a comercialização de um novo fármaco; em média, 10 anos. Outro, está relacionado com a exaustão das metodologias utilizadas para o isolamento de microrganismos em laboratório. As técnicas convencionais de cultivo em laboratório, muitas vezes, não são capazes de reproduzir a pressão ambiental específica (estímulos químicos, físicos e biológicos) para a ativação dos genes biossintéticos. Esse fator limita o acesso a fontes biológicas diversificadas e subestima a identificação de compostos com potencial biotecnológico (Amoutzias et al 2016, Rodríguez-Rojas et al., 2013).

Outra questão envolvendo os antibióticos é o uso excessivo dos compostos já conhecidos. Em 1945, ao receber o prêmio Nobel pela descoberta da penicilina, o próprio Fleming alertou que o uso desmedido dos antibióticos poderia selecionar microrganismos resistentes aos fármacos em ambiente hospitalar (Amoutzias G 2016; Crofts et al 2017).

Além disso, o uso antibióticos extrapolou a sua função convencional de combater infecções na clínica médica e veterinária, e foi incorporado aos setores produtivos como aquicultura e na pecuária, a fim de diminuir prevenir infecções, reduzir a mortalidade e melhorar a taxa de crescimento animal (Alduina 2020). Porém, os resíduos de antibióticos gerados por esses seguimentos são considerados poluentes ambientais e contribuem com a disseminação de ARGs (Xi et al 2009). Isso porquê, quando utilizados como promotores de crescimento, os antibióticos são misturados à ração e são pouco absorvidos pelo trato intestinal dos animais. O resultado é a excreção dos resíduos destas substâncias que podem acumular no solo ao serem transportados por lixiviação ou quando são utilizados como material particulado na aplicação de esterco em campos agrícolas (McEachran et al 2015; Nesme et al 2014). Com relação as águas servidas provenientes da agricultura, indústria, hospitais e áreas urbanas, os tratamentos utilizados nas estações são ineficientes na remoção completa dos resíduos antibióticos e microrganismos portadores ARGs que, eventualmente podem ser lançados no solo, rios e mares (Li et al 2016; Li et al 2018).

Juntos, todos esses fatores favorecem a seleção natural de fenótipos microbianos resistentes, que continuam a se multiplicar na presença dos antibióticos administrado em níveis terapêuticos, ao qual eram anteriormente sensíveis, e são capazes de difundir os genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (ARGs), através de mutações e/ou transferência horizontal de genes (Cosgrove 2006). Estima-se que as infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos sejam responsáveis por dez milhões de mortes em todo o mundo até o ano 2050 (O'Neill, 2016).

Potencial biotecnológico da microbiota marinha

Ao considerarmos que 70% da superfície da Terra é ocupada por oceanos e cerca de 91% das espécies marinhas aguardam descrição, podemos sugerir que ainda há muito a ser explorado quanto à diversidade ecológica, química e o potencial biotecnológico no ecossistema marinho (Trindade et al 2015, Romano et al 2017).

Sobre microbiota marinha, sabe-se que esse é um grupo que domina os oceanos em termos de biomassa total, é o principal responsável pelos ciclos biogeoquímicos e representa cerca de 98% da produtividade primária marinha (Jensen & Fenical 1994, Falkowski et al 2008, Coutinho et al 2018). Quanto à riqueza e abundância das espécies, era frequente a premissa de que o bacterioplâncton possuía representação ubíqua. Acreditava-se que os eventos abióticos, como as correntes marinhas, superavam às barreiras geográficas e facilitavam a dispersão uniforme das comunidades microbianas ao longo da coluna d'água de diferentes regiões (Fenchel & Finlay, 2004). Entretanto, a composição genética do bacterioplâncton pode variar de acordo com a salinidade, profundidade e temperatura (Pommier et al 2006). Além disso, os micro-organismos marinhos também podem ser encontrados no sedimento e em simbiose com animais e vegetais (Flemming & Wuertz, 2019).

Contudo, a microbiota marinha ainda não atingiu a mesma importância do ecossistema terrestre quanto à prospecção de compostos bioativos. Em 2016, por exemplo, o número relatado de compostos bioativos produzido por bactérias marinhas foi de 179 (Blunt et al 2018). Os principais desafios no estudo do ecossistema marinho estão relacionados aos fatores ambientais que dificultam a reprodutibilidade de sua natureza dinâmica (clima, salinidade e correntes de massas de água), e por apenas 1% dos micro-organismos serem facilmente cultiváveis em laboratórios (Amoutzias et al 2016).

Abordagem Metagenômica na pesquisa da microbiota marinha

Mesmo diante das dificuldades amostrais, o avanço nas áreas de bioquímica, genética e computação, viabilizaram estudos e indicam o ambiente marinho como um campo promissor para a descoberta de produtos naturais (Gilbert & Dupont 2011, Petersen et al 2019). Dentre esses avanços, as metodologias que independem do cultivo, como a metagenômica, termo proposto por Handelsman (1998), proporcionam o estudo do DNA total recuperado diretamente de amostras ambientais e, associado às técnicas moleculares de sequenciamento,

auxiliam na elucidação da dinâmica populacional e mecanismos genéticos de microbiotas complexas e ainda pouco exploradas.

A abordagem metagenômica foi utilizada nos ambiciosos estudos *Tara Ocean Voyage* e *Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition* (GOS), por exemplo (Rusch et al., 2007, Sunagawa et al 2015). Em pesquisas como essas, a extração do DNA total é realizada diretamente de amostras da água de superfície, coletadas durante expedições. Dados substanciais sobre a diversidade genética são gerados e auxiliam no entendimento da ecologia microbiana marinha. Para essa finalidade, o uso do termo metataxonomia é mais apropriado, pois, o sequenciamento de amplicons, genes marcadores específicos, são utilizados para determinar a composição taxonômica e filogenética de determinada microbiota (Jünemann et al 2017, Comin et al 2020).

O gene 16S rRNA é frequentemente utilizado como marcador filogenético padrão ouro desde o estudo pioneiro de Carl Woese (1987) até os dias atuais. Isso porque, esse gene é responsável pela síntese da subunidade 16S do ribossomo procariótico. Além de estar presente em todas os procariotos, o gene 16S rRNA possui outras características que o tornam um eficiente marcador filogenético. Uma delas é o fato desse gene possuir regiões variáveis e altamente conservadas entre as espécies bacterianas e evolui a uma taxa constante (Gołębiewski, M., & Tretyn, 2019). As regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA entre as espécies favorecem o desenho de iniciadores específicos da transcrição e aumentam as chances de descrever a biodiversidade (Caporaso et al 2010).

As plataformas de sequenciamento evoluíram bastante desde àquela idealizada por Sanger (77), para estabelecer a ordem correta dos quatro nucleotídeos presentes na molécula de DNA, conhecida como sequenciamento de primeira geração. O método de sequenciamento de Sanger além de laborioso, possibilita analisar uma única sequência de um determinado trecho do DNA (Behjati & Tarpey 2013, Garrido-Cardenas et al 2017). Então, para atender aos estudos que investigam microbiomas complexos são utilizadas outras plataformas capazes de realizar o sequenciamento simultâneo de milhões de pequenos fragmentos de DNA (Jünemann et al 2017). As primeiras plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) surgiram a partir do ano de 2004 e são conhecidas como sequenciamento de segunda geração (SGS) (Gomez-Escribano et al

2016). Nas tecnologias comercializadas pela Roche 454, AB SOLiD, Illumina e Ion Torrent, o sequenciamento é baseado em leituras curtas e a amplificação clonal é realizada *in vitro*.

Sequenciamentos de terceira geração (TGS) já são comercializadas. A tecnologia TGS desenvolvida pela Pacific Bioscience (PacBio) e Oxford Nanopore, consiste em leituras longas e em tempo real. Dentre as vantagens do TGS, destacam-se a eliminação da etapa de preparação das bibliotecas de DNA, não requerer o uso de reagentes para realizar o sequenciamento e a utilização de equipamento compactos, eficientes em trabalhos de campo. Contudo, essa tecnologia ainda é emergente e pouco acessível devido ao seu alto custo (Goodwin & McCombie 2016, Arboleda & Xian 2018).

Além de ser uma ferramenta para determinação taxonômica de micro-organismos, os dados gerados por análises metagenômicas também podem representar umas das alternativas para a descoberta de novos compostos bioativos. A escolha da plataforma de sequenciamento e o tipo de abordagem utilizada favorecem o acesso às rotas biossintéticas de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos.

O acesso às rotas biossintéticas ocorre quando há um sequenciamento não direcionado (*Shotgun*) do DNA metagenômico de uma determinada amostra (Quince et al 2017). Nesse tipo de estudo, os dados gerados após o sequenciamento devem ser montados com o auxílio das ferramentas de bioinformática. Nessa etapa, os algoritmos de montagem alinham os fragmentos curtos (*reads*), gerados no sequenciamento, em sequências longas e contíguas (*contigs*). Assim, com as sequências montadas, é possível triar o genoma, fazer previsões e anotações gênicas. Ou seja, o algoritmo faz a varredura nas sequências de DNA, localiza as regiões com potencial funcional e prediz quais compostos podem ser sintetizados pelos micro-organismos presentes na amostra (Jensen et al 2013, Jünemann et al 2017).

Dessa forma, os avanços das tecnologias de sequenciamento massivo aliados à abordagem metagenômica contribuem para a soma do conhecimento gerado por projetos que visam estabelecer comparações entre a microbiota presente em simbiontes, sedimento oceânico e água marinha (Woyke et al 2006, Udvary et al 2007, Sun et al 2015, Selvin et al 2016, Karimi et al 2017), que investigam o potencial marinho como reservatórios de novas espécies de bactérias e de seus compostos naturais (Feling et al 2003,

Dholakira et al 2017, Gong et al 2018). Além disso, esses dados geram a demanda por mais estudos em diferentes regiões e evidenciam a importância de investimentos contínuos para prospecção de compostos marinhos com potencial interesse biotecnológico.

Filos bacterianos de importância biotecnológica presentes no ecossistema marinho

Micro-organismos do solo terrestre foram, por muitos anos, a fonte mais utilizada para a prospecção de compostos bioativos. Contudo, bactérias marinhas também podem representar uma importante fonte de compostos bioativos, visto que possuem em seus genomas aglomerados de genes biossintéticos de metabólitos secundários (Goodfellow et al 2018).

A potencialidade da microbiota marinha em produzir compostos químicos com propriedades metabólicas e funcionais diferentes dos já conhecidos, pode estar relacionada, sobretudo, à adaptação as condições específicas e ao tipo de interação biológica existente no bioma aquático. Ao interagir de forma simbiótica com eucariotos (microalgas e esponjas marinhas), por exemplo, micro-organismos tendem a produzir metabólitos secundários tóxicos que evitam a predação dos seus hospedeiros e que podem ser uma fonte de compostos únicos e exclusivos para a tecnologia de novos fármacos (Storey et al 2020, Zhang et al 2020).

Estima-se que todos os filos microbianos possuam representantes marinhos capazes de produzir compostos com ação biológica de interesse biotecnológico. Porém, dentre eles, destacam-se os filos bacterianos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (Stincone & Brandelli 2020).

Filo Actinobacteria

As actinobactérias formam uma das maiores e mais importantes unidades taxonômicas dentro do domínio bacteriano. Na Era de Ouro da descoberta de antibióticos, foram isolados importantes compostos bioativos a partir de representantes do filo Actinobacteria. Cerca de dois terços de todos os antibacterianos

utilizados na clínica atual ou seus derivados semissintéticos são produzidos por essas bactérias. Antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina, rifamicinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e glicopeptídeos são sintetizados industrialmente a partir desses micro-organismos (Charusanti et al 2012, Genilloud 2017).

Dentro desse filo, o gênero *Streptomyces* recebeu notável atenção e foi utilizado, nas décadas de 70 e 80, na caracterização dos primeiros genes envolvidos na biossíntese dos metabólitos secundários (Ziemert et al 2016).

De forma geral, Actinobacteria é um grupo representado por bactérias gram-positivas, com alto teor de guanina/citosina (GC) em seus genomas. Embora sejam unicelulares, podem produzir um micélio não septado, de filamentos delgados. São quimio-heterotróficos, capazes de utilizar uma ampla variedade de fontes nutricionais, e adaptados a vários tipos de habitats terrestres e aquáticos (Barka et al 2015).

No ambiente marinho, as actinobactérias tem importância ecológica na melhoria dos parâmetros físicos e ambientais através decomposição e reciclagem de compostos orgânicos, na mineralização de matéria orgânica e fixação de nitrogênio (Subramani & Aalbersberg 2012). São bactérias amplamente distribuídas na superfície do mar, coluna de água, sedimento e em simbiose com vertebrados e invertebrados. Além disso, possuem gêneros adaptados e exclusivos a esse ecossistema, incluindo *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Aeromicrobium*, *Marinospora*, *Salinispora*, *Verrucosipora* (Ward et al 2006).

Os produtos naturais sintetizados por actinobactérias marinhas podem ser explorados para o desenvolvimento de drogas anticâncer, antibióticos e enzimas (Sharma et al 2019). Estudos pioneiros realizados entre 1997 e 1999 descreveram o composto tiocoralina que, além de possuir atividade antimicrobiana, apresentava ação anticâncer. Tal composto foi isolado das actinobactérias *Micromonospora* sp. ML1 e *Micromonospora* ACM2-092, e os autores demonstraram sua atividade *in vitro* contra células cancerígenas humanas (Baz et al 1997). Recentemente, estudos *in vitro* apontaram o tiocoralina como inibidor da proliferação de células cancerígenas de mama com baixa toxicidade às células do fígado (Jin et al 2019).

Outros estudos também investigaram o potencial do sedimento marinho como reservatórios de novas espécies de actinobactérias marinhas. Através de métodos moleculares e comparações filogenéticas, Dholakiya

e colaboradores (2017) isolaram uma nova espécie, que apresentou 84% de semelhança com *Streptomyces variabilis*. E os testes realizados com a nova cepa demonstraram o potencial antibacteriano de amplo espectro do seu metabólito secundário.

Filo Firmicutes

O filo Firmicutes possui gêneros bacterianos fenotipicamente diversos. Nesse grupo, prevalecem os fenótipos gram-positivos, embora haja representantes com coloração de Gram variável, anaeróbios facultativos ou estritos, com algumas espécies que podem produzir endosporos e a maioria possui baixo teor de guanina/citosina (GC) em seu genoma. Por essa razão, a caracterização sistemática baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA é a forma mais eficiente de inclusão de membros nesse filo (Galperin 2013).

Com importância para clínica médica, *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Listeria monocytogenes* são exemplos de espécies que fazem parte desse grande filo (Megrian et al 2020). Os probióticos lactobacilos são outros representantes desse filo, popularmente conhecidos por promoverem o equilíbrio da microbiota intestinal dos seres humanos e outros animais (Wang et al 2019).

O gênero *Bacillus*, contudo, merece destaque por produzir variados metabólitos secundários com ampla atividade biotecnológica, frequentemente utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. As bactérias desse gênero são aeróbicas, formadoras de endoesporos e estão distribuídas em ambientes como solo, aquático e em interações com vegetais (Wang et al 2015).

A espécie *Bacillus subtilis*, inclusive, possui cerca de 5% de DNA compostos por agrupamentos genéticos responsáveis pela biossíntese de uma vasta diversidade estrutural de produtos naturais com ação antibiótica (Stein 2005). No ecossistema marinho, o sedimento oceânico pode servir de reservatório para esse gênero e representa uma importante fonte para descoberta de novos fármacos (Mojid Mondol 2012).

Filo Proteobacteria

Em termos de abundância, o filo Proteobacteria constitui um dos maiores e mais diversos e pode ser encontrado em diferentes habitats. A característica fenotípica que abrangem todas as bactérias desse filo é a presença da membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) e, por isso, coram gram-negativo. Quanto à morfologia, as proteobactérias podem apresentar diferentes formas (bacilos curtos, curvos e espiralados), e, em sua maioria, apresenta motilidade. Sobre o genótipo, a filogenia baseada no gene 16S rRNA divide o filo em seis classes: Alfa, Beta, Gama, Delta Epsilon e Zeta-Proteobacteria (Mukhopadhyaya et al 2012).

Os membros desse filo possuem importância ecológica e médica. A classe alfa- Proteobacteria inclui gêneros como o *Rhizobium*, que desempenham funções chave nos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre. Na clínica médica, a classe gama-Proteobacteria abriga as famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pseudomonadaceae que possuem representantes patogênicos para animais e seres humanos (Kersters et al 2006).

Em ambientes aquáticos, esse filo pode representar abundância de até 80% da microbiota marinha e alguns produtos naturais são relacionados aos seus membros (Desriac et al 2013). O salimabrometo, por exemplo, é um composto com ação antibiótica isolado da delta-Proteobacteria *Myxobacteria* marinha (Schmid et al 2018). Dentre os representantes marinhos, o gênero *Pseudomonas* merece destaque. Esse gênero, inicialmente associado ao habitat terrestre, abriga nove espécies marinhas, portadoras de aglomerados genéticos altamente especializados para a síntese de produtos naturais, em um grupo descrito como *Pseudomonas pertucinogena* (Bollinger et al 2018).

O potencial de sintetizar importantes produtos naturais atribuído as proteobactérias e aos demais filios, demonstra que a exploração da microbiota marinha em busca de compostos químicos, como os policetídeos, peptídeos não ribossômicos, alcaloides e terpenoides, pode ser uma via sustentável importante para a descoberta de novas moléculas eficientes contra bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) cânceres e infecções graves. Outro ponto a ser considerado é a citotoxicidade e eficiência desses compostos. Em ensaios pré-clínicos,

os produtos anticâncer de origem marinha podem ser menos tóxicos às células animais e podem apresentar maior eficiência quando comparado aos seus concorrentes terrestres (Stincone & Brandelli 2020).

Compostos bioativos: classe dos policetídeos

A busca por compostos bioativos, realizadas por mais de meio século, gerou a necessidade em aprofundar cada vez mais os estudos sobre a origem, estrutura química e o potencial biotecnológico dos metabólitos secundários. Dentre as várias estruturas possíveis, logo foi constatado que a classe dos policetídeos era uma importante base estrutural dos metabólitos com potencial biotecnológico. O antibiótico Eritromicina, o antifúngico Anfotericina B e o antiparasitário Avermectina são exemplos da utilização conhecida dessa classe de metabólitos (Kornfuehrer & Eustaquio 2019).

Além do uso já conhecido, os policetídeos podem ser úteis, também, como base no desenvolvimento de novas drogas. Na bioengenharia, a natureza colinear da biossíntese dos policetídeos, responsável por gerar compostos com uma grande variedade de estrutura carbônica, é considerada como uma plataforma promissora para obtenção de novos fármacos. Mutações genéticas direcionadas e criteriosas podem induzir a diversidade molecular e, conseqüentemente, efetuar mudanças na ação biológica de novos compostos (Drufva et al 2020).

Embora a maioria dos policetídeos utilizados na clínica médica seja derivado de produtos naturais de origem terrestres, no ambiente marinho as condições abióticas podem favorecer a seleção de micro-organismos que produzam policetídeos igualmente relevantes.

Em prospecções realizadas em sedimento das regiões tropicais e subtropicais, Fenical e seus colaboradores, em 2003, isolaram novas actinobactérias exclusivas do ambiente marinho, *Salinospora tropica* e *S. arenicola*. Após a identificação das espécies, os ensaios bioquímicos com os extratos produzidos pelas novas cepas demonstraram atividade biológica antitumoral *in vitro*, em células humana. Posteriormente, o fracionamento do extrato bruto levou ao isolamento de um policetídeo que, à época, recebeu a denominação

de Salinosporamide A (Fenical, 2009). Atualmente, o Salinosporamide A é um dos poucos compostos marinhos a chegar na fase III de ensaios clínicos anticâncer (McCauley et al 2020).

Outro composto policetídeo com ação anticâncer é o Pederin. O princípio ativo desse composto foi inicialmente identificado através da toxina produzida por invertebrados terrestres das espécies *Paederus fabricius* e *Paederidus mulsant*, com a finalidade de proteger seus ovos de possíveis predadores. Trinta anos depois, compostos semelhantes aos terrestres foram identificados e atribuídos ao gênero *Pseudomonas*, simbiontes de esponjas marinhas (Piel et al 2005).

Além do potencial anticâncer, os policetídeos de origem marinha também podem apresentar atividade antiviral (Zhang et al 2020), podem ser o princípio ativo de compostos contra agentes bacterianos multirresistentes a fármacos (Kizhakkekalam & Chakraborty 2020) e antifúngicos (Arasu et al 2013).

Biossíntese de policetídeos

Os compostos da classe dos policetídeos apresentam múltiplas funções β -hidroxicetona ou β -hidroxialdeído e podem ser sintetizados por plantas, fungos e bactérias. Os metabólitos policetídeos sintetizados por micro-organismos, possuem alta diversidade estrutural e apresentam distribuição irregular entre as espécies produtoras. A biossíntese dos policetídeos assemelha-se à dos ácidos graxos quanto aos precursores envolvidos na reação e aos mecanismos químicos utilizados na extensão do esqueleto carbônico. A estrutura química desse composto é o resultado de uma linha de montagem orientada por enzimas denominadas de Policetídeo Sintase (PKS) (Hopwood 2004, Hertweck 2009, Jenke-Kodama & Dittmann 2009, Zhang 2016).

As PKS agem semelhantes a uma linha de montagem, pois sua estrutura modular abriga domínios catalíticos responsáveis pela união entre pequenos blocos de ácidos orgânicos que formam o esqueleto carbônico do composto final. Dessa forma, a partir de precursores como actilcoenzima A e malonil-CoA, cada domínio da PKS é responsável por catalisar sucessivas condensações descarboxilativas do tipo Claisen,

seguidas de reações redutoras do grupo ceto, para a formação de um policetídeo (Hopwood 2004, Hertweck 2009).

Uma PKS pode conter diferentes tipos de domínios catalíticos com funções específicas dependendo do tipo de montagem do composto final. Porém, ao menos três desses domínios, denominados de PKS mínima, são essenciais para biossíntese de um policetídeo. De forma geral, a PKS mínima inicia e estende a cadeia carbônica utilizando o domínio aciltransferase (AT), que é responsável pela seleção e ativação do substrato. Em seguida, o domínio proteína transportadora de acil (ACP) associado à fosfopantetina (P-Pant), transporta o bloco substrato/grupo acil promovendo a elongação da cadeia policetídica. Por último, o domínio cetossintase (KS), catalisa as condensações do tipo Claisen, através de ligações carbono-carbono, entre o substrato e a cadeia policetídica em formação. Os outros domínios, quando presentes, possuem a função de modificar o bloco acil após a condensação: cetoreductase (KR), dehidrate (DH), enoil redutase (ER), Metiltransferase (MT). Por fim, ao término da montagem estrutural, o policetídeo é liberado pelo domínio tioesterase (TE) (Figura 1) (Hopwood 2004, Yadav et al 2003, Fischbach et al 2006).

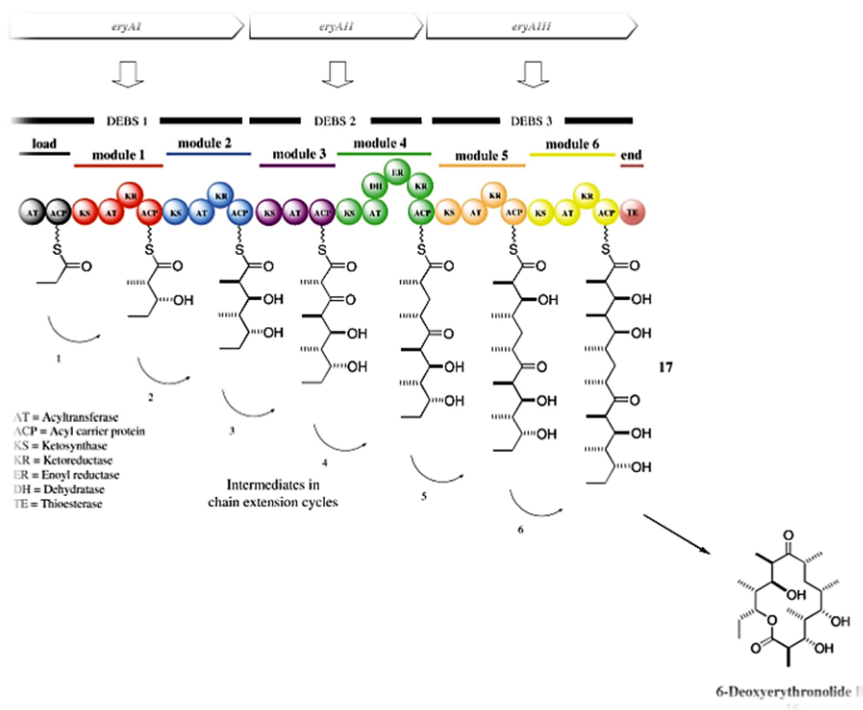


Figura. 1. Representação dos cluster gênico, módulos e domínios catalíticos envolvidos na biossíntese da eritromicina elaborada por Staunton e Weissman, 2001.

Assim, de acordo com a natureza molecular e a forma como os domínios catalíticos orientam o tipo de arranjo estrutural do policetídeo, as enzimas PKS's são classificadas em três famílias: PKS I, PKS II, PKS III.

Família PKS I

As enzimas pertencentes à família PKS do tipo I são multifuncionais e divididas em dois grupos, de acordo com a quantidade de vezes que o domínio KS catalisa a etapa de alongamento da cadeia carbônica. No grupo PKS I interativa, durante o alongamento da estrutura química do policetídeo, o domínio KS catalisa várias rodadas em um único módulo. Os compostos finais, catalisados por enzimas interativas, apresentam cadeia carbônica simples e estão associados a metabólitos sintetizados por fungos. A lovastatina é exemplo de composto produzido por esse tipo de sistema (Hertweck 2009).

O segundo grupo, presente em sistemas bacterianos, é a PKS I não interativa. Nesse grupo há vários módulos sequenciais e, em cada módulo, o domínio KS catalisa apenas uma rodada de alongamento da cadeia carbônica. As enzimas não interativas são responsáveis por catalisar a síntese de pequenos compostos aromáticos importantes como, por exemplo, a eritromicina. O sistema envolvido na biossíntese da eritromicina é expresso por três genes *ery I*, *ery II* e *ery III* que codificam três grandes enzimas com aproximadamente 300 kDa, denominadas de 6-desoxierronolida B sintase (DEBS I, DEBS II e DEBS III). As DEBS's trabalham em conjunto e, cada uma, possui dois módulos com domínios não interativos responsáveis por carregar e condensar unidades acil até a formação do composto final (Hutchinson & Fujii 1995, Chen & Du 2015).

Os domínios catalíticos que estão presentes na PKS mínima de enzimas da família tipo I são KS, AT e ACP. Dentre esses, o domínio KS é utilizado como marcador molecular em triagem de novos compostos policetídeos (Courtois et al 2003).

Família PKSII

A segunda família, PKSII, abriga as enzimas mono ou bifuncionais, geralmente envolvidas na montagem de compostos cíclicos e aromáticos. Metabólitos sintetizados a partir da PKSII são produzidos, sobretudo, por bactérias do grupo dos actinomicetos (Chen & Du 2015).

Policetídeos catalisados por enzimas PKS II fazem parte do esqueleto carbônico de importantes fármacos, como o antibiótico tetraciclina e o anticâncer doxorrubicina. A PKS II orienta a montagem dos compostos policetídeos de forma interativa. Porém, diferente dos mecanismos utilizados pela PKS I, as enzimas do tipo II não requerem extensos ciclos de condensação ou redução para a formação do composto final (Hutchinson & Fujii 1995). A PKS mínima, nessa família, é composta por três domínios catalíticos: duas subunidades de cetossintase ($KS\alpha$ e $KS\beta$), responsáveis por catalisar a condensação entre o aciltioéster e o esqueleto de carbono em crescimento e uma proteína transportadora de acil (ACP). Domínios catalíticos adicionais, exclusivos do sistema PKS II, também participam do dobramento da cadeia policetílica: ciclases (CYC) e aromatasas (ARO) (Hertweck 2009).

Os genes que expressam o domínio $KS\alpha$ possuem áreas altamente conservadas e, frequentemente, são utilizados como marcador molecular de compostos catalisados por PKSII (Metsä-Ketelä et al 1999, Ogasawara et al 2015).

Família PKS III

A família PKS III é comumente associada à síntese de metabolitos secundários de plantas. Nesses organismos, a linha de montagem enzimática foi detalhada e estão envolvidas na síntese de compostos cíclicos, incluindo chalconas, estilbenos, flavonóides e α -pironas. Contudo, ainda pouco elucidada, há relatos da participação de PKS III na biossíntese de compostos produzidos por bactérias e fungos (Pfeifer et al 2001, Chen & Du 2015, Othoum et al 2019).

A classe PKS III agrupa pequenas enzimas interativas e a diversidade estrutural dos compostos montados por essa família é dependente do tipo de substrato utilizado na reação, seus extensores e o tipo de condensação da cadeia carbônica. PKS III pode catalisar reações a partir de precursores acetila e cinamoil-coenzima A. Comumente, as extensões utilizadas nesse tipo de reação são malonil ou metilmalonil, e as condensações aldólica, ou lactonização. Domínios catalíticos, como metiltransferases (MTs) ou oxidoreduases, podem auxiliar a montagem do composto final. Reações catalisadas por PKS III não requerem, necessariamente, o domínio ACP, diferente das PKS's I e II. Nessas condições, as unidades formadas são transportadas e incorporadas às novas unidades diretamente da CoA (Hug et al 2018).

As três famílias enzimáticas (PKSI, PSKII e PKSIII), são, portanto, responsáveis pela notável diversidade molecular e função bioativa dos metabolitos da classe dos policetídeos (Yadav et al 2003).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar amostras de sedimentos marinhos, coletados no litoral de Lucena/PB, quanto a abundância e diversidade bacteriana, e prospectar cepas produtoras de metabólitos secundário da classe dos policetídeos.

Objetivos específicos

- Determinar a abundância taxonômica e a diversidade funcional da microbiota presente nas amostras;
- Isolamento e classificação de extratos biológicos produzidos pela fermentação de micro-organismo cultivados a partir das amostras de sedimento marinho.

ÁREA DE ESTUDO

O município de Lucena, situado no litoral norte da Paraíba, entre as coordenadas geográficas de 34°51'01" e 34°54'08" W e 6°52'19" e 6°56'31" S, possui uma população estimada de 13.080 habitantes e uma área de 89,204 km². Nessa região, as atividades econômicas predominantes são a pesca, comércio, agricultura, pecuária, turismo e, segundo dados do IBGE, o índice de desenvolvimento humano municipal (IDHM) é de 0,583. (IBGE, 2017).

Dentre as atividades exercidas no município, o turismo de veraneio é fortalecido, pois, Lucena está situada na região metropolitana de João Pessoa, possui 24 km² de planície costeira e extensão de 15 km de praia. Além disso, a costa do município apresenta como atrativos as suas regiões de estuários, falésias e água do mar quente (Fernandes, 2011).

Ao longo dos seus 15 km, Lucena abriga sete praias: Costinha, Fagundes, Gameleira, Ponta de Lucena, Lucena, Camaçari e Bonsucesso. De grande influência na região marinha, a foz do Rio Paraíba desagua na praia de Costinha e abriga um estuário contemplado pela Portaria MMA nº 9 de 23/01/2007. A portaria dispõe sobre o reconhecimento de áreas prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Já, nas proximidades da praia de Bonsucesso, há o encontro da foz do Rio Miriri com o oceano atlântico.

O clima no litoral paraibano, de acordo com Instituto de Desenvolvimento Municipal e Estadual (IDEME), é do tipo tropical quente e úmido, com temperaturas médias elevadas (22 a 30°C), e chuvas abundantes. Os principais mecanismos causadores de chuvas nessa região são os Sistemas Frontais, a Zona de Convergência Intertropical (ZCIT) e as perturbações ondulatórias no campo dos ventos alísios. O regime de chuvas em Lucena apresenta uma pré-estação chuvosa no mês de dezembro e o período chuvoso, propriamente dito, entre os meses de abril e julho. É no litoral que ocorrem os maiores índices de chuva do estado e a precipitação anual pode ultrapassar aos 1600mm (Medeiros, 2015).

Sobre a geomorfologia da planície costeira, a faixa litorânea de Lucena é composta por areias quartzosas marinhas, um tipo de solo arenoso, profundo e de baixa fertilidade natural. Nas regiões de manguezal, contudo, há deposição de sedimentos finos de natureza argilosiltosa, argilosa, detritos orgânicos e material mineral arenoso.

METODOLOGIA

Coleta de sedimentos marinhos

As expedições foram realizadas na Praia de Lucena, situada na região metropolitana de João Pessoa/PB-Brasil. Com o auxílio de uma draga Van Veen, foram coletadas 21 amostras de sedimento marinho em regiões próximas a margem continental com profundidade de 10 metros (Figura 2), entre os meses de dezembro 2016 e setembro 2017 (Tabela 1). Reunimos, também, informações sobre temperatura, salinidade e pH da água intersticial, com o auxílio de um analisador multiparâmetro (Hanna Y) (Tabela 2). As amostras foram armazenadas em contêineres estéreis, refrigerados a 4°C e enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia (Lamim) da Universidade Federal Rural de Pernambuco para processamento. Por fim, para as nossas análises, as amostras foram divididas em dois grupos, período seco, e período chuvoso, conforme as informações da Agência Executiva de Gestão das águas (AESAPB), sobre a precipitação média na microrregião geográfica do litoral norte/PB (Tabela 3).



Figura 2. Pontos de coleta dos sedimentos marinhos. Fonte: Google Maps.

Table 1. Localização dos pontos de coleta do sedimento marinho na Praia de Lucena/ Pabaíba – Brasil.

Collection		
point	Date	Latitude, Longitude
1	Dec/2016	6.896313S, 34.869187W
2	Dec/2016	6.893422S, 34.874026W
3	Dec/2016	6.89524S, 34.871993W
4	Jan/2017	6.893003S, 34.87183W
5	Jan/2017	6.889096S, 34.880201W
6	Jan/2017	6.891482S, 34.877787W
7	Fev/2017	6.893369S, 34.874823W
8	Fev/2017	6.890146S, 34.873841W
9	Fev/2017	6.890331S, 34.87693W
10	Apr/2017	6.896163S, 34.870148W
11	Apr/2017	6.892522S, 34.874221W
12	Apr/2017	6.89515S, 34.870564W
13	May/2017	6.894161S, 34.873265W
14	May/2017	6.891068S, 34.87894W
15	May/2017	6.894064S, 34.871645W
16	Jun/2017	6.89198S, 34.877598W
17	Jun/2017	6.891089S, 34.876372W
18	Jun/2017	6.894376S, 34.870171W
19	Sep/2017	6.899566S, 34.861317W
20	Sep/2017	6.869525S, 34.86147W
21	Sep/2017	6.899405S, 34.862048W

Tabela 2. Parâmetros ambientais observados na água intersticial presentes na área de coleta das amostras de sedimento marinho.

Date	Time	Temperature	pH	OD	OD	Conductivity	TDS	Salinity
	h/min	°C		%	mg/L	μS/cm	ppt	ppt
Dec - 2016	09:47	28.68	7.45	51.2	2.96	56220	29.22	41.32
Jan - 2017	11:37	30.57	7.86	55.5	3.32	63300	31.65	42.52
Feb - 2017	06:13	28.15	8.51	39.5	2.45	62010	31.01	41.64
Apr - 2017	07:54	29.11	8.53	37.9	2.33	61610	30.8	41.29
May - 2017	06:43	28.61	7.62	42.7	3.16	59890	30.9	39.9
Jun - 2017	10:31	27.41	8.59	48.2	3.12	56300	28.15	37.34

Tabela 3. Precipitação média observadas no litoral norte do estado da Paraíba – Brasil.

Month/ Year	Average (mm)
Dec - 2016	96
Jan - 2017	78.8
Fev - 2017	70.7
Apr - 2017	183.5
May - 2017	172.5
Jun - 2017	168.8

Análise Metagenômica

Extração de DNA metagenômico

As 21 amostras de sedimento coletado passaram por uma centrifugação prévia (5000g/10 minutos), para remoção da água intersticial e, em seguida, foram pesadas. Para extração do DNA metagenômico foram utilizados 0,25 gramas de cada amostra, conforme as instruções do kit comercial Power Soil™ DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, CA, EUA). A concentração e a pureza do DNA metagenômico foram determinadas com um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Minnesota, EUA). A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, desenvolvido com solução de DNA SybrSafe (Invitrogen, EUA). Os dados foram registrados em sistema de fotodocumentação com luz ultravioleta. Por fim, o DNA metagenômico foi refrigerado a -20 °.

Amplificação de regiões específicas do gene 16S rRNA

Após a extração do DNA metagenômico das 21 amostras, quantidades equimolares, de cada uma das três amostras/mês, foram utilizadas para preparação das soluções de trabalho (n=7), com a concentração de 10 ng/μL. Assim, o DNA metagenômico das 7 amostras foram utilizados como substrato para avaliar a diversidade taxonômica e abundância das bactérias presentes no sedimento marinho. Nessa etapa, o par de iniciadores S-C-Act-235-a-S-20 e S-CAct-878-a-A-19 (tabela 4), foi utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação das regiões entre V3 a V5 do gene 16S rRNA (Stach 2003).

Os seguintes parâmetros foram utilizados para a realização da PCR: para cada reação de 25 μL, foram adicionados 30 ng/μL do DNA metagenômico, 5 μL do tampão Go Taq G2 5x, 0,5 μL de solução de dNTP's (10 mM cada), 2,5 μL de cada iniciador, cada um na concentração 5,0 μM, 0,2 μL da enzima Go Taq G2 Hot Start 5x (Promega, Madison, WI, USA) e 7,3 μL de água ultrapura. As etapas da reação foram: uma

desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 45 seg, anelamento a 60°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1 minutos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O amplicon gerado continha aproximadamente 640 pb e para sua visualização, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM pH 8,0; EDTA 1,0 mM), revelado com solução de SybrSafe DNA (Invitrogen, EUA) por um sistema de fotodocumentação com luz UV. Os produtos da PCR foram armazenados a -20 °C.

Construção da biblioteca do gene 16S rRNA

Após a obtenção dos produtos amplificados com as regiões entre V3 e V5, iniciamos a construção da biblioteca do gene 16S rRNA. As 7 bibliotecas foram montadas em duas etapas, de acordo com o descrito pelas especificações do protocolo personalizado do kit NexteraXT (Illumina, San Diego, CA). O par de iniciadores utilizados nessa etapa (515F-XT e 806RTX) (tabela 4), amplifica a região V4 do gene 16S rRNA (Caporaso, 2012), e os seguintes parâmetros foram utilizados para realização da PCR: para cada reação de 25 µL, foram adicionados 30 ng/µL do DNA metagenômico de cada amostra, 6 µL do tampão Go Taq G2 (5x), 3,6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 µL de solução de dNTP's (10 mM cada), 0,75 µL de cada iniciador, cada um na concentração 5,0 µM, 0,2 µL da enzima Go Taq G2 Hot Start 5x (Promega, Madison, WI, USA) e 17,1 µL de água ultrapura. As etapas da reação foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos, com desnaturação a 98°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 45 seg, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para visualização das amostras, foi realizada uma eletroforese a 100V, em gel de agarose 2% submerso em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM pH 8,0; EDTA 1,0 mM), e revelado com solução de SybrSafe DNA (Invitrogen, EUA) por um sistema de fotodocumentação com luz UV.

Por fim, os *amplicons* obtidos foram purificados pelo kit AMPure XP beads (Beckman Coulter), de acordo com as especificações do fabricante.

Para a construção da biblioteca, foram utilizados 5 μ L do produto de PCR purificado, 5 μ L do Nextera XT index primer N7xx, 5 μ L do Nextera XT index primer S5xx, 25 μ L do 2x KAPA HiFi HotStart Ready e 10 μ L de água ultrapura. Os parâmetros da reação foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 8 ciclos, com desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Por fim, a concentração das bibliotecas de amplicons foi estimada através de fluorimetria, utilizando o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) no Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bibliotecas foram normalizadas e colocadas para o sequenciamento metagenômico na Central Genômica da Universidade Federal do Ceará, localizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). O sequenciador utilizado foi o MiSeq System (Illumina, San Diego, CA), utilizando o MiSeq Reagent Kit V2 (300 ciclos), de acordo com as especificações do fabricante (Illumina, San Diego, CA).

Análise metagenômica da biblioteca de 16S rRNA

A análise dos dados gerados após o sequenciamento foi realizada através de uma plataforma One Codex, como descrita por Minot & Geenfield (2015). Os grupos taxonômicos foram agrupados através do algoritmo de classificação taxonômica ($k\text{-mer}=31$) conforme sua abundância em cada uma das amostras sequenciadas.

Resumidamente, as leituras geradas no sequenciamento de alto rendimento são identificadas pela One Codex, de acordo com o conjunto de $k\text{-mers}$ exclusivos de grupos taxonômicos específicos. Dessa forma, cada leitura é dividida em sequências sobrepostas de comprimento 31 pb. O algoritmo, então, por meio de uma plataforma de dados online, usa um banco de dados de referência que, atualmente, inclui aproximadamente 40.000 genomas de bactérias, vírus, fungos e protozoários. Cada leitura pode ser resumida como acertos de k -

mer e descrevem o conjunto completo de *k-mers* taxonomicamente informativos encontrados nessa leitura, bem como suas posições.

Table 4. Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo.

Identification	Sequence	Reference
S-C-Act-235-a-S-20	5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTTG - 3'	Stach, 2003
S-CAct-878-a-A-19	5'- CCGTACTCCCCAGGCGGGG - 3'	Stach, 2003
515F-XT	5'- GCCAGCMGCCGCGGTAA - 3'	Caporaso et al., 2012
Região específica ao index	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGT - 3'	
806R-TX	5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3'	Caporaso et al., 2012
Região específica ao index	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	
27F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'	Lane, 1991
1525R	5'- AAGGAGGTGWTCCARCC - 3'	Lane, 1991

Simbolos dos primers degenerados de acordo com IUPAC: M = A; C, H = A, C; T, V = A, C; G, W = A

or T.

Construção da biblioteca metagenômica Shotgun

Além da análise taxonômica, realizamos um sequenciamento não direcionado (Shotgun), a fim de analisar os genes funcionais presentes em nossas amostras de DNA metagenômico. Para isso, quantidades equimolares das 7 amostras de DNA metagenômico foram utilizadas como substrato para a construção de uma biblioteca. Nessa etapa, utilizamos o protocolo personalizado Nextera XT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA). A biblioteca metagenômica foi sequenciada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), por meio da plataforma de nova geração do

Sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA). Foi utilizado o MiSeq Reagent Kit V2 (500 ciclos), de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA).

Análise das sequências

As sequências metagenômicas foram submetidas a verificações de qualidade usando FastQC v0.10.1 (Andrews, Simon, nd) e BBDuk (versão 37.95; <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/bb-user-guide-tools/bbduk-guide/>). O BBDuk foi usado para remover contaminantes e leituras de sequência que continham a coluna do adaptador ou onde a qualidade caiu para zero. Além disso, as leituras de sequência com quatro ou mais bases ou aquelas com uma pontuação de qualidade média inferior a 25 e comprimento ≤ 100 bp foram removidas. ASVs foram inferidos usando QIIME2 (versão 2019.10) (Bolyen et al., 2019). A diversidade alfa (diversidade de Shannon, ASVs observados e uniformidade de Pielou) e a diversidade beta (distância de Bray-Curtis) foram determinadas usando o plug-in de diversidade q2 em QIIME2 a uma profundidade de amostragem de 6.060.

Montagem de metagenoma e caracterização funcional

Depois que os nucleotídeos de baixa qualidade foram removidos, as leituras de sequenciamento de DNA emparelhado para cada amostra foram montadas em metagenomas usando parâmetros padrão e vários valores de k-mer com MEGAHIT (v 1.1.2) (Li et al., 2016, 2015). Para explorar o potencial metabólico da amostra shotgun, os dados foram comparados com os subsistemas SEED (Overbeek et al., 2014) no servidor MG-RAST usando um valor “e” máximo de $1e-5$, identidade mínima de 60% e alinhamentos mínimos de 15 aa para proteína e 15 bp para DNA.

Detecção do gene metagenoma de resistência a antibióticos (ARG)

Um banco de dados de nucleotídeos BLAST (Doster et al 2020) foi criado usando sequências de proteínas ARG FASTA homólogas encontradas no Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v1.1.8 (McArthur et al 2013) e banco de dados MEGARES (Doster et al 2020) com um valor de corte de 1,0 - 10 para garantir alta confiança de alinhamento. Quando um segmento de sequência foi alinhado a vários ARGs, a ocorrência com o valor mais baixo, junto com o comprimento de alinhamento mais longo, foi considerada a correspondência verdadeira.

Cultivo de bactérias do sedimento marinho

Isolamento de bactérias das amostras de sedimento marinho

Nessa etapa, segundo descrito por Nevine, B. et al (2000), foram pesados 25g do sedimento e adicionados em 225mL de água marinha artificial (15,15 g de NaCl; 2,18 g de MgCl₂.6H₂O; 2,85 g de MgSO₄.7H₂O; 0,65 g de CaCl₂; 0,116 g de NaHCO₃; 0,414 g de KCl; 1L H₂O destilada). Após 30 minutos, diluições seriadas foram preparadas e alíquotas de cada diluição foram adicionadas por spread-plate em ágar nitrito de amido (20g de amido solúvel; 1g KNO₃; 0,5g K₂HPO₄; 0,5G MgSO₄.7H₂O; 0,5g NaCl; 15g ágar; 1L H₂O destilada). As placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias. Após incubação, colônias com diferentes perfis morfológicos foram selecionadas para realização da extração de DNA e identificação molecular através sequenciamento.

Extração de DNA dos isolados marinhos

A identificação, em nível de espécie, dos microrganismos isolados do sedimento marinho, foi realizada através do sequenciamento das regiões conservadas do gene rRNA 16S de bactérias. Para tanto, o primeiro passo dessa etapa é a extração do DNA dos isolados, realizada como o descrito por Sá, M.C.A de et al (2013). Resumidamente, os isolados foram cultivados em ágar Brain heart infusion agar (BHI) por 24h em temperatura ambiente. Após esse período, uma alçada da bactéria foi adicionada em um microtubo com 500ul de água ultrapura. Os microtubos seguiram para um banho seco a 100°C por 11 minutos e, logo após, para um banho em gelo por 4 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo. A confirmação da extração foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose 1%, para visualização do DNA em fotodocumentação com luz UV, revelado com solução de SybrSafe DNA (Invitrogen, EUA). A quantificação e a pureza do DNA obtido foram medidas pela absorbância de 260nm (A260) por um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Minnesota, EUA).

Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada através dos iniciadores universais, 27F e 1525R (tabela 4), descritos por Lane, 1991. Assim, foi realizada a PCR com os seguintes parâmetros: 30 ng do DNA metagenômico, 12,5 µL do Kit MyTaq RedMix (Bioline, Meridian Bioscience, EUA), 2,5 µL de cada iniciador, cada um na concentração 10 µM e 4,5 µL de água ultrapura. As etapas da reação foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 45 seg, anelamento a 55°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1 minutos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cyler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para confirmação da amplificação, foi realizada uma eletroforese a 100V, em gel de agarose 1% submerso em

tampão TBE (Tris-Borato 45 mM pH 8,0; EDTA 1,0 mM), e revelado com solução de SybrSafe DNA (Invitrogen, EUA) por um sistema de fotodocumentação com luz UV. Após amplificação do gene 16S rRNA, as amostras foram enviadas para o sequenciamento na empresa Macrogen (<http://www.macrogen>).

Fermentação e extração de metabólitos produzidos pelos isolados marinhos

Fermentação e extração de metabólitos extracelulares

Para realizar a análise do extrato extracelular produzido pelos isolados marinhos, utilizamos o protocolo de fermentação descrito por Penesyan e colaboradores (2011), com modificações. Nessa etapa, os isolados foram expostos a condições favoráveis à produção de metabólitos secundários. Para isso, cada isolado foi ajustado a uma densidade óptica de 1 a 600nm e em seguida adicionado à 50 mL de caldo marinho (Peptona 5g, Extrato de Levedura 1g, Citrato Férrico 0,1g, Cloreto de Sódio 19,45g, Cloreto de Magnésio 5,9g, Sulfato de Magnésio 3,24g, Cloreto de Cálcio 1,8g, Cloreto de Potássio 0,55g, Bicarbonato de Sódio 0,16g, 1L H₂O destilada) e incubado a 28°C por 24h. O pré-inoculo foi adicionado à 500mL de caldo marinho e incubado a 28°C por 10 dias. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 10 min a 10°C. Após a centrifugação do caldo fermentado, 500 mL do sobrenadante foram lavados três vezes com solvente Acetato de Etila (150, 100 e 50 mL) com auxílio de um funil de separação. Em seguida o extrato foi concentrado em um rotavapor e o seu perfil químico avaliado por HLPC no laboratório de Química Orgânica e Agrícola da universidade Federal Rural de Pernambuco.

Análise GC-MS

A análise qualitativa por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) (220-MS IT GC, Varian, Walnut Creek, CA, EUA) foi realizada em um sistema com detector seletivo de massa, uma sílica fundida DB-5 não polar coluna capilar (30 mx 0,25 mm x 0,25 µm) (J & W Scientific). A temperatura do forno

foi programada de 60 a 240 ° C a uma taxa de 3 ° C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector eram de 260 ° C. O espectrômetro de massa foi programado em EI 70 eV com intervalo de varredura de 0,5 se fragmentos de 40 a 550 Da. equipado com a mesma coluna e programa de temperatura dos experimentos GC-FID, com os seguintes parâmetros: gás portador = hélio; taxa de fluxo = 1 mL min⁻¹; modo de divisão (1:30); volume injetado = 1 µL de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas dos picos de GC-MS na ordem da eluição da coluna DB-5 e expressa como uma porcentagem relativa da área total dos cromatogramas.

Identificação de componentes

A identificação dos componentes foi baseada em índices de retenção de GC-MS e por comparação de computador com a biblioteca espectral de massa do sistema de dados GC-MS (NIST 14) e espectros de massa publicados (Adams 2007).

RESULTADOS

Nossos dados mostraram estabilidade em vários parâmetros físico-químicos na água intersticial, independente do regime de chuvas na área de coleta de sedimentos marinhos. Por exemplo, a temperatura variou de 28°C a 30°C na estação seca e 27°C e 29°C na estação chuvosa. O pH variou entre 7,4 e 8,5 na estação seca e entre 7,6 e 8,5 no período chuvoso. Além disso, a salinidade variou entre 41,3 e 42,5 ppt durante a estação seca e 37,3 e 41,2 ppt na estação chuvosa. Todos os parâmetros físico-químicos estão listados na Tabela 2.

Em nossa análise metagenômica referentes à abundância dos filos bacterianos, obtivemos leituras correspondentes aos filos Verrucomicrobia, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomicetos e Proteobacteria. Descobrimos que tanto no período de seco (Figura 3 e Figura 4), quanto no período chuvoso (Figura 5) os filos mais abundantes foram Actinobacteria, Planctomicetos e Proteobacteria. Exploramos, também, a diversidade taxonômica das classes bacterianas quanto a sua abundância. O perfil geral referente às classes foi semelhante nos dois períodos analisados e obtivemos leituras de correspondência a onze classes. No período seco (Figura 6 e Figura 7) e no período chuvoso (Figura 8), as classes mais abundantes foram *Actinobacteria*, *Planctomycetia*, *Deltaproteobacteria*. Em nossas amostras também observamos correspondência a vinte e quatro gêneros bacterianos. No período seco (Figura 9), e no período chuvoso (Figura 10), foi possível identificar a presença de diferentes gêneros bacterianos, dentre eles; *Ilumatobacter*, *Nocardioides*, *Streptomyces*, *blastopirellula*, *Pirellula*, *Thermostilla*, *Myxococcus*, *Pseudomonas*, *Racemicystis*, *Sandaracinus* (Tabela 5).

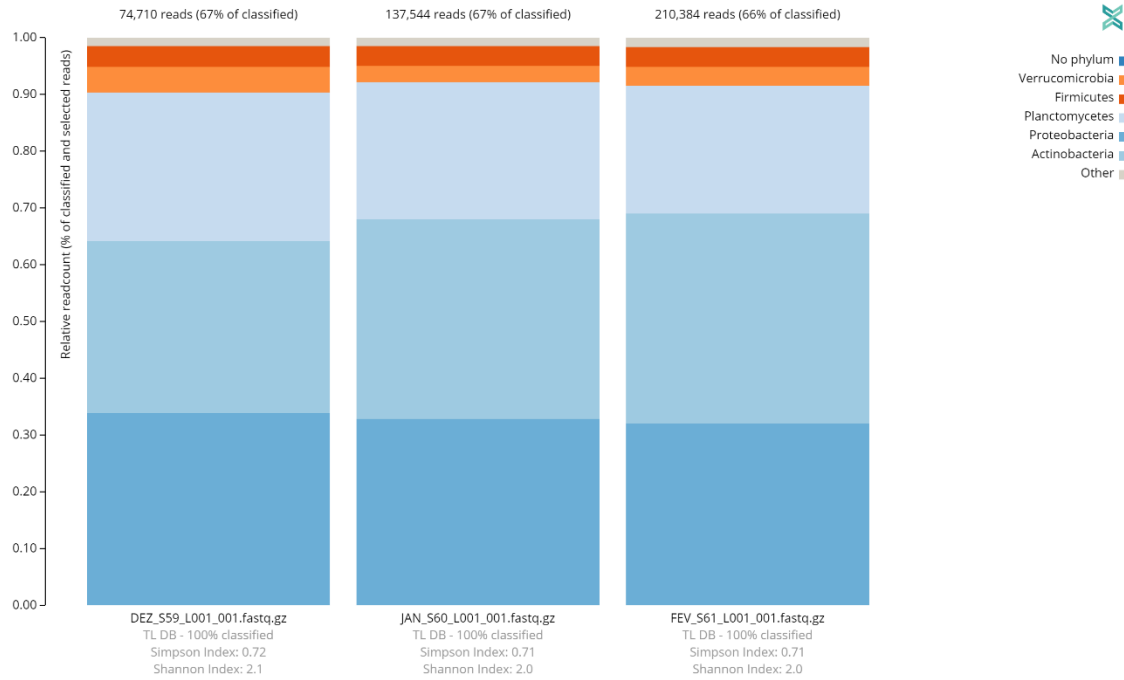


Figura 3. Abundancia dos Filos bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período seco, correspondentes aos meses de dezembro, janeiro e fevereiro

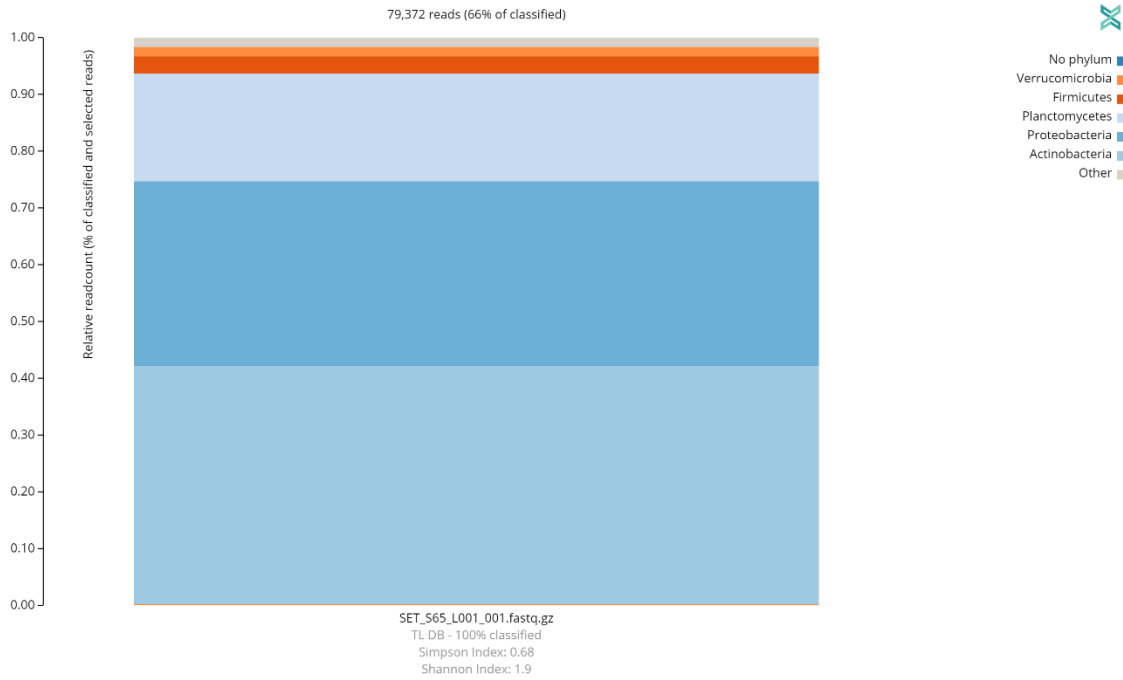


Figura 4. Abundancia dos Filos bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período seco, correspondentes ao mês de setembro.

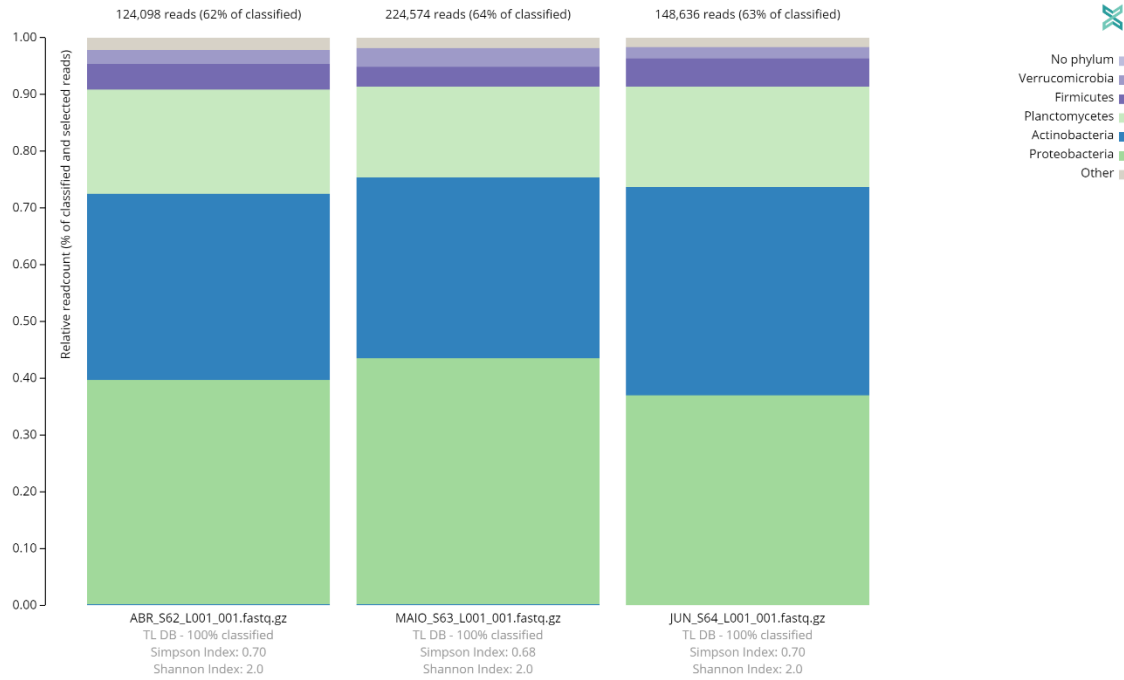


Figura 5. Abundancia dos Filos bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período chuvoso, correspondentes aos meses de abril, maio e junho.

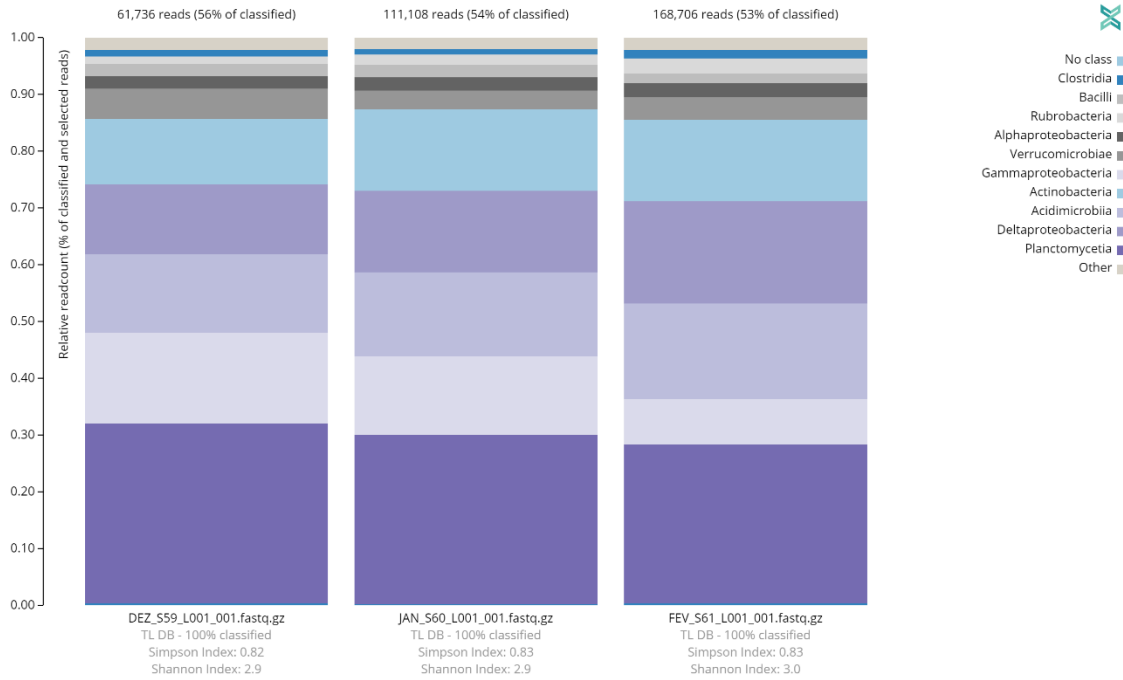


Figura 6. Abundância das classes bacterianas presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período seco, correspondentes aos meses de dezembro, janeiro e fevereiro.

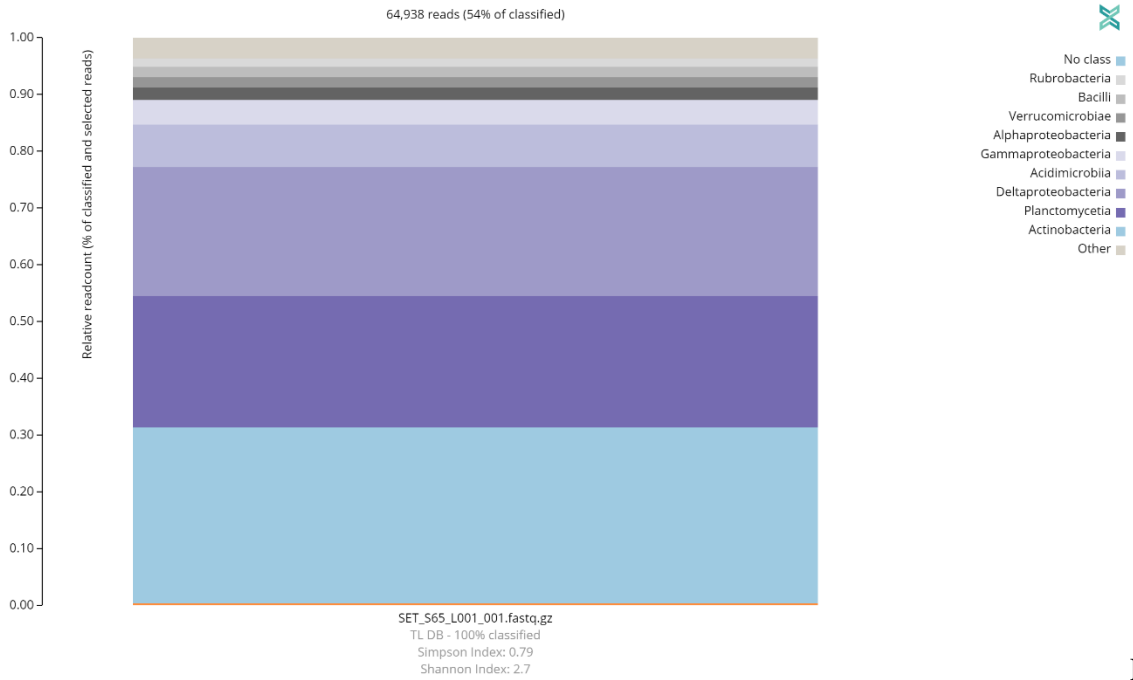


Figura 7. Abundancia

das classes bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período seco, correspondentes ao mês de setembro.

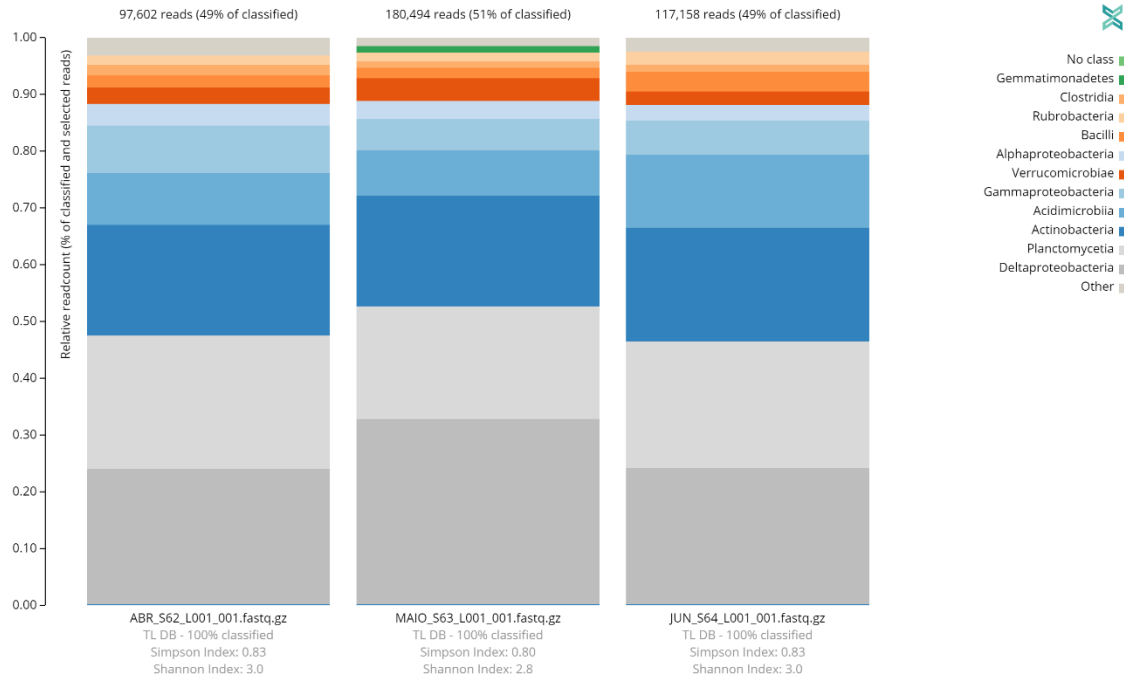


Figura 8. Abundancia das classes bacterianas presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período chuvoso, correspondentes aos meses de abril, maio e junho.

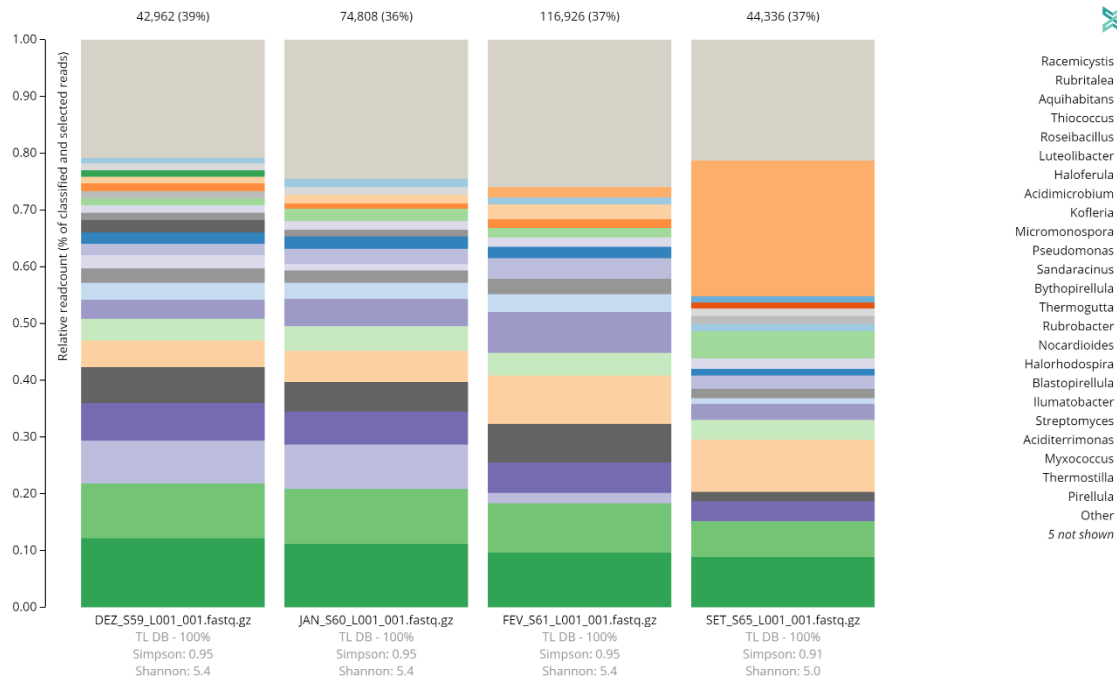


Figura 9. Abundância dos gêneros bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período seco, correspondentes aos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e setembro.

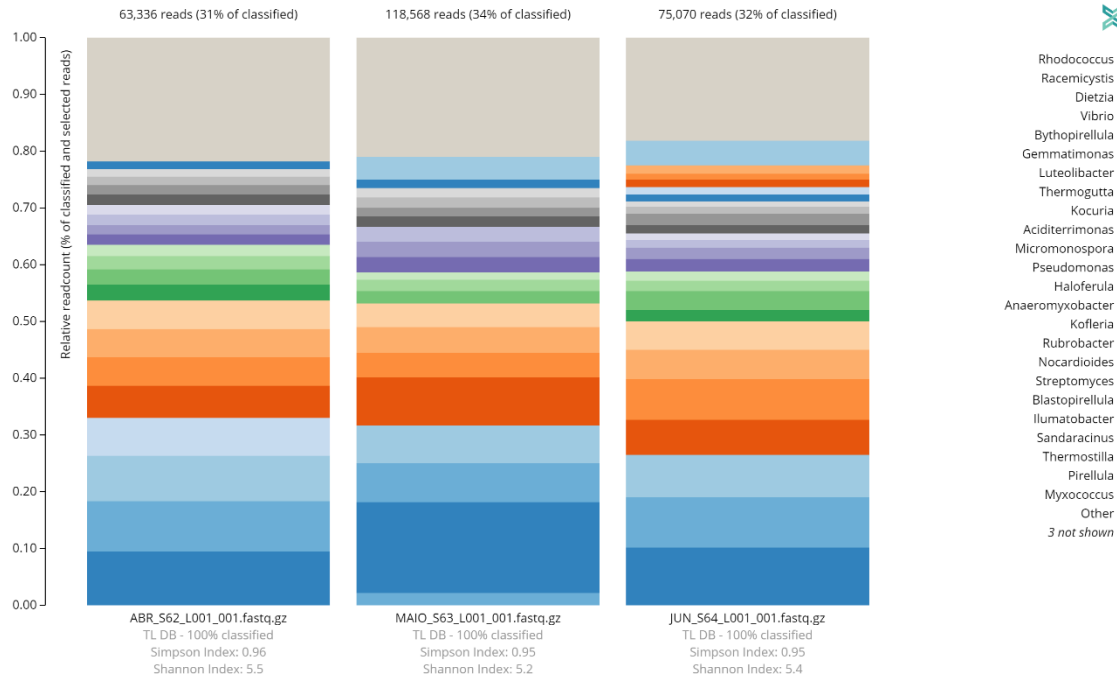


Figura 10. Abundancia dos gêneros bacterianos presente nas amostras de sedimento marinho coletadas no período chuvoso, correspondentes aos meses de abril, maio e junho.

Tabela 5. Taxonomia dos grupos bacterianos identificados a partir da biblioteca metagenômica do gene 16S rRNA gene presentes no sediment marinho.

Phylum	Class	Genus
		<i>Ilumatobacter</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i>
		<i>Streptomyces</i>
		<i>Blastopirellula</i>
Planctomicetos	Planctomycetia	<i>Pirellula</i>
		<i>Thermostilla</i>
		<i>Myxococcus</i>
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	<i>Racemicystis</i>
		<i>Sandaracinus</i>
		Gammaproteobacteria <i>Pseudomonas</i>

Em nossas análises relacionadas ao sequenciamento não direcionado, Shotgun, o conjunto de dados obtido continha 1.955.215 sequências e 338.795.202 pares de bases, com um comprimento médio de 173 bps. Das sequências testadas, 125.316 (6,41%) não passaram pelo pipeline de QC, e a desreplicação identificou 95.496 dessas sequências como leituras duplicadas artificiais. Entre as sequências que passaram no QC, 12.249 sequências (1%) continham genes de RNA ribossomal, 1.131.597 sequências (64,50%) proteínas previstas com funções conhecidas e 610.602 sequências (34,80%) proteínas previstas com funções desconhecidas. As curvas de rarefação foram produzidas usando o banco de dados M5NR (Wilke et al 2020). Tais dados representam as espécies de categorias taxonômicas do shotgun. Os pontos de corte utilizados foram: comprimento de alinhamento, 15 bp; valor e, e-5; e porcentagem de identidade, 60%.

Após o uso do MG-RAST, descobrimos que Proteobacteria foi o filo mais abundante, com 75,6% das leituras, seguido por Firmicutes (13,24%) e Bacteroidetes (7,52%) de 1.955.215 sequências (Tabela 6). As análises de Kraken mostraram 1.370.769 leituras de sequência e abundância taxonômica semelhante (Figura 3). Por exemplo, MG-RAST identificou 238 pedidos e Kraken 209 pedidos. Entretanto, em relação ao filo Actinobacteria, houve diferença crítica na classificação taxonômica entre os dois algoritmos, uma vez que o MG-RAST atribuiu 5939 leituras e Kraken 18568 leituras (Tabela 6).

Tabela 6. Diversidade taxonômica atribuída ao conjunto de dados do shotgun

Phylum	MGRAST	Kraken
<i>Actinobacteria</i>	5939	18568
<i>Bacteroidetes</i>	53520	36401
<i>Chloroflexi</i>	2470	425
<i>Cyanobacteria</i>	1986	1442
<i>Deinococcus-Thermus</i>	414	416
<i>Firmicutes</i>	94292	111680
<i>Planctomycetes</i>	7007	4109
<i>Proteobacteria</i>	537238	539878
<i>Unclassified</i> (<i>derived from Bacteria</i>)	1131	0
<i>Verrucomicrobia</i>	1656	345
	705653	713264

A distribuição das categorias funcionais para KEGG (Kanehisa et al 2002), COG (Tatusoy et al 1997) e eggNOGs (Jensen et al 2008) no nível mais alto suportado por essas hierarquias funcionais é mostrada na Figura 11. Os dados mostram que a maioria das funções estavam relacionadas ao metabolismo. Contigs foram usados para prever 83.843 proteínas, das quais apenas 71.688 (85,5%) tiveram correspondência blastp significativa (valor E 10^{-5}) contra o banco de dados de proteínas NR RefSeq. Um total de 26.298 (31,4%) proteínas foram classificadas usando Gene Ontology (GOs) por Blast2GO e Interpro. No filo Actinobacteria, 5481 proteínas tiveram funções relacionadas às suas categorias funcionais (Figura 12).

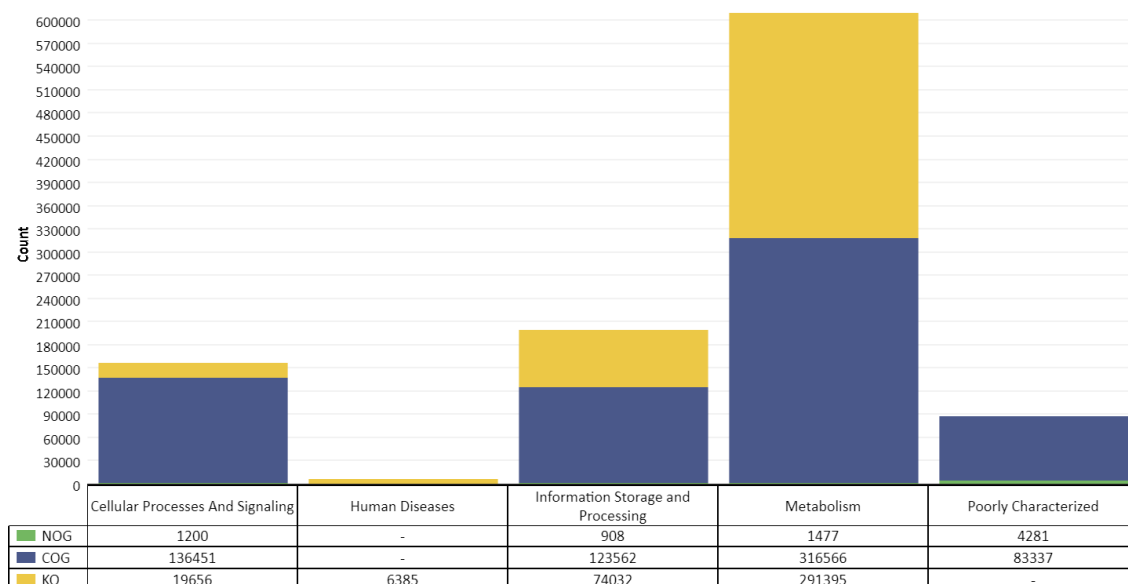


Figura 11. Categorias funcionais gerais (nível de subsistema 1) para KEGG, COG e eggNOGs. Um painel geral dos subsistemas também é mostrado e a abundância relativa de sequências por categoria funcional pode ser observada. Cada cor indica a porcentagem de leituras com funções de proteína previstas registradas para cada categoria.

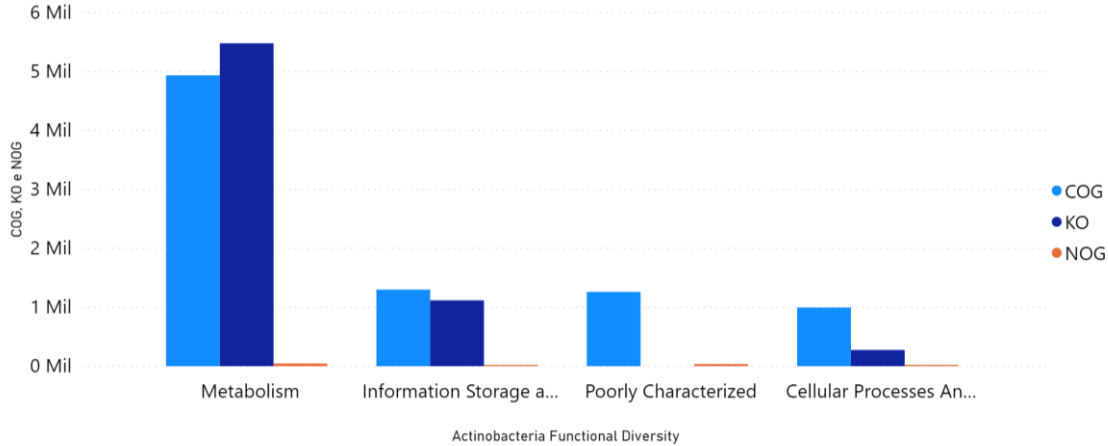


Figura 12. Gráfico de barras mostrando a caracterização funcional (nível de subsistema 1) para KEGG, COG e eggNOGs no filo Actinobacteria.

Os resultados também revelaram a presença de 26 genes envolvidos em duas vias de metabolismo no gênero *Streptomyces* (Figura 13): 1) terpenóides, policetídeos e carotenóides; e 2) outros metabólitos secundários, incluindo estilbeno.

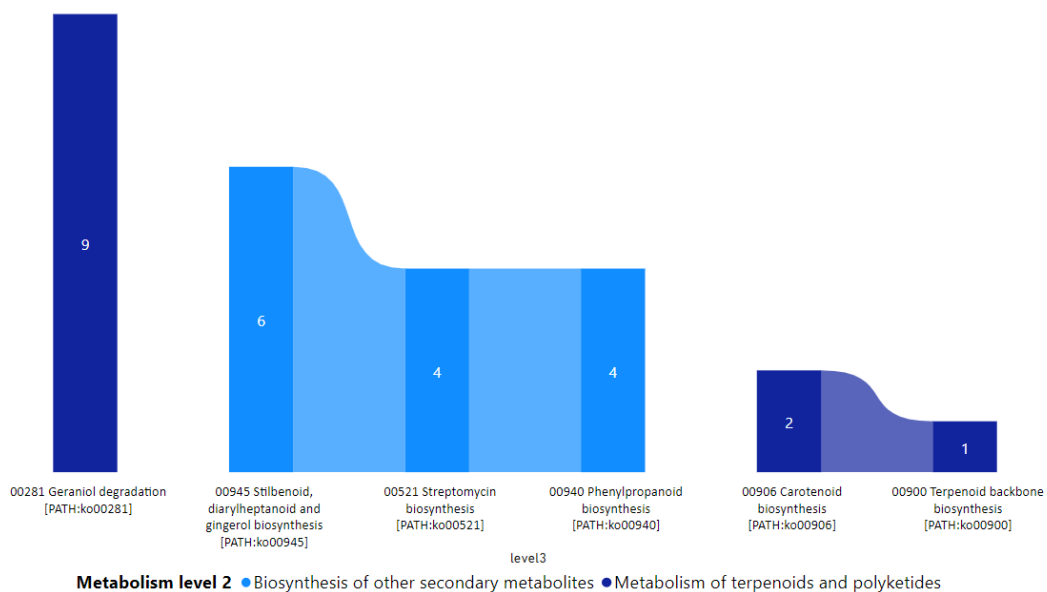


Figura 13. Categorias funcionais para KEGG (nível de subsistema 3) no gênero *Streptomyces* usando sequenciamento metagenômico.

A busca por genes de resistência a antibióticos revelou 7.902 leituras no banco de dados MEGARES e 8.562 sequências no CARD, com comprimento médio de 100 bp e porcentagem de identidade média de 91%. As classes de antibióticos cujos microrganismos nas amostras apresentam genes de resistência são mostradas na figura 14.

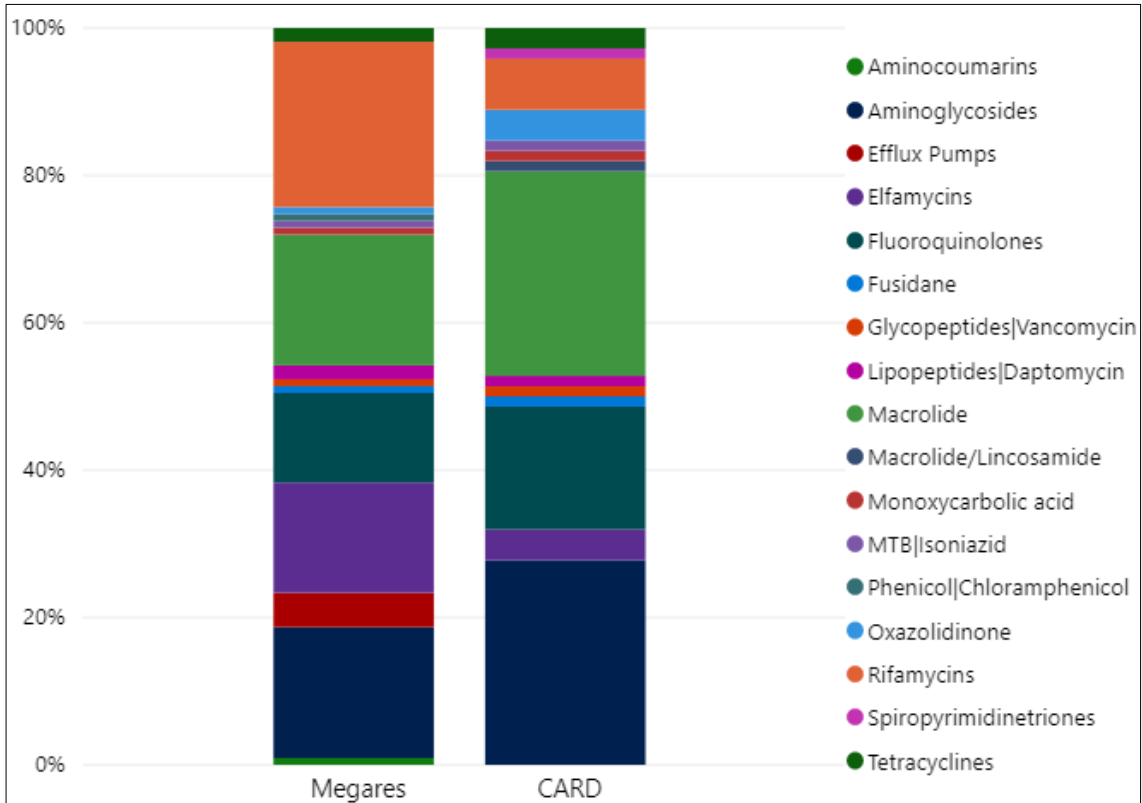


Figura 14. Classes de antibióticos cujos microrganismos nas amostras possuem genes de resistência a medicamentos.

As Figuras 9 e 10 mostram os gêneros bacterianos identificados em amostras de sedimentos marinhos que foram utilizados na etapa de fermentação e extração de metabólitos secundários extracelular. Embora a diversidade taxonômica tenha sido semelhante à de outras amostras de sedimento, apenas nove isolados pertencentes ao filo Proteobacteria (Classe Gammaproteobacteria) foram obtidos após cultivo em laboratório.

Após o sequenciamento do gene 16S rRNA e comparação das sequências com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), constatamos que sete isolados pertenciam ao gênero *Pseudomonas* e dois isolados ao gênero *Psychrobacter* (Tabela 6). Quatro dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* ssp. (1, 2, 6 e 8) foram analisados quanto ao seu potencial para sintetizar compostos da classe dos policetídeos, após fermentação e extração de metabólitos secundários extracelulares.

Os espectros de massa obtidos, cujos picos dos cromatogramas são mostrados na Figura 15, demonstraram a identificação de um composto químico precursor da via metabólica do policetídeo: ácido orselínico; e quatro compostos químicos da classe dos policetídeos: 4-terc-Butilfenol, Lactona do ácido triacético, 5,7-Dihidroxi-2-etilcromona, Filoquinona (Tabela 7).

Tabela 7. Sequencias do gene 16S rRNA dos isolados marinhos comparadas às sequências da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Isolate	Quality (%)	Base pairs	Genus	Identity (%)	Coverage (%)	Access number
1	96.80	1419	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.86	100	MH703512.1
2	89.10	1280	<i>Pseudomonas</i> ssp.	98.28	100	MK414950.1
3	97.30	1349	<i>Pseudomonas putida</i>	99.93	100	MK537387.1
4	85.30	558	<i>Psychrobacter</i> ssp.	99.28	100	MK398101.1
5	75.20	827	<i>Pseudomonas</i> ssp.	98.89	97	MK332581.1
6	95.50	933	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.89	100	MK590418.1
7	93.30	1337	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.85	100	MG757952.1
8	76.40	699	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.14	100	KX817891.1
9	95.30	1474	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	99.86	100	AB688097.1

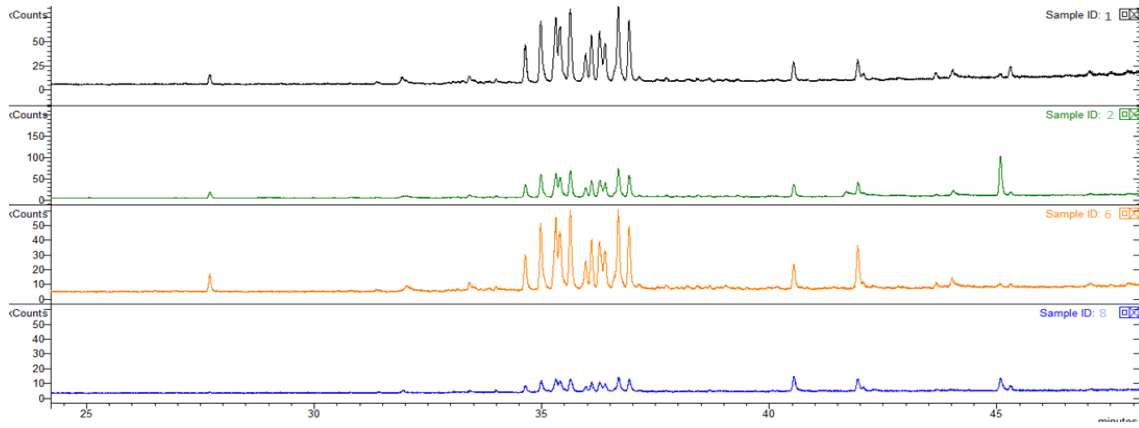
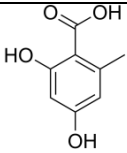
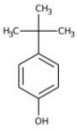
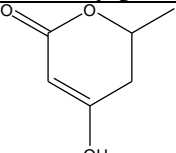
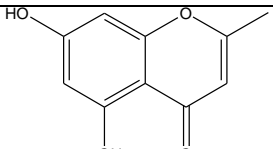
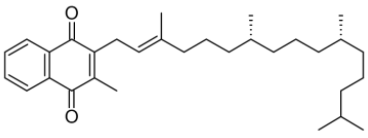


Figura 15. Cromatogramas de extratos metabólicos de *Pseudomonas* spp. 1, 2, 6 e 8, respectivamente.

Tabela 6. Constituintes químicos identificados em extratos metabólicos de *Pseudomonas* spp.

Tempo de Retenção	Compostos	Formula molecular	Amostra 1 (%)	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 8
32.015	 Orselinic acid	$C_8H_8O_4$	1.39	1.00	3.91	0.67
34.995	 4-tert-Butylphenol	$C_{10}H_{14}O$	8.78	8.16	7.99	8.12
35.609	 Triacetic acid lactone	$C_6H_6O_3$	12.39	11.89	13.24	13.90
36.709	 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone	$C_{10}H_8O$	13.15	14.68	14.14	13.27
40.532	 Phylloquinone	$C_{31}H_{46}O_2$	2.35	3.33	4.54	4.00

DISCUSSÃO

O avanço biotecnológico nas áreas do sequenciamento genético e o desenvolvimento de algoritmos, que permitem as análises *in silico*, viabiliza uma abordagem de estudo guiado pela triagem do perfil taxonômico e identificação de clusters de genes biossintéticos (BGCs), em comunidades microbianas com potencial genético para a produção de compostos bioativos. Quanto ao perfil da microbiota presente no sedimento marinho, estima-se que o número total de células é $2,9 \times 10^{29}$ a $5,4 \times 10^{29}$, contudo a diversidade e abundância taxonômica variam de acordo com profundidade dos sedimentos, a concentração de sulfato, a concentração de matéria orgânica e a presença ou ausência de oxigênio dissolvido (Hoshino et al., 2020).

Em nossas análises referentes às bibliotecas metagenômica do gene 16S rRNA, não encontramos diferenças na abundância dos filos Actinobacteria e Planctomycetes entre as amostras coletadas no período chuvoso ou período seco. Porém, nos meses chuvosos, quando a precipitação média observada no litoral norte do Estado da Paraíba foi de $174,9 \pm 7,6$ mm, houve maior abundância do filo Proteobacteria em relação aos outros filos. As bactérias pertencentes a esse grupo são abundantes nos biomas terrestres e aquáticos, contudo, também são associadas à microbiota intestinal de seres humanos e outros animais. Com isso, não podemos desconsiderar que a maior abundância de Proteobacteria pode refletir a ação antrópica e a poluição ambiental na região (Chen et al. 2019). Isso porquê, nossas amostras foram coletadas em uma área do município de Lucena cuja população estimada é de 13.080 habitantes, as atividades econômicas predominantes na região são a pesca, comércio, agricultura, pecuária, turismo e, segundo dados do IBGE, o índice de desenvolvimento humano municipal (IDHM) é de 0,583. (IBGE, 2017). Além disso, ao longo de seus 15 km de praia, Lucena recebe grande influência do rio Paraíba.

Em nossa análise metagenômica pela abordagem do Shotgun, inclusive, buscamos identificar vias metabólicas relacionadas à genes de resistência a antimicrobianos, como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, tetraciclina, beta-lactâmicos, macrolídeos, bombas de efluxo de drogas múltiplas. De acordo com Amarasiri et al. (2016), cepas resistentes a antibióticos surgem no ambiente marinho

devido a diferentes razões: 1) escoamento costeiro e mistura frequente de bactérias de fontes terrestres e marinhas durante ciclos entre as marés; 2) ação antrópica, por meio do depósito de resíduos em rios ou diretamente no oceano.

Segundo relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2018), o consumo de antibióticos no Brasil, definido por doses diárias/1000 habitantes, variou entre 10,3 e 22,8. Dentre eles, os mais consumidos pertencem à classe dos beta-lactâmicos, macrolídeos e quinolonas. O consumo de antibióticos e a ação antrópica foram, também, abordadas em um estudo realizado em áreas de mangue, em cinco países, incluindo o Brasil. Os pesquisadores constataram que a composição taxonômica com predominância proteobactérias e a maior abundância relativa de ARGs beta-lactâmicos, bombas de efluxo de múltiplas drogas e macrolídeo foram diretamente correlacionadas às regiões com maior intervenção antropogênica (Imchen and Kumavath 2020). Em nossos achados, além da predominância de proteobactérias, 179 ARGs foram associados a 17 classes de antibióticos, sendo os genes mais abundantes para resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos e rifamicinas.

Embora a ação antrópica seja uma das causas para o surgimento de ARGs nos oceanos, em uma determinada microbiota a maioria das cepas produtoras de antibióticos carregam, também, ARGs aos antibióticos que produzem (Sengupta et al., 2013). No ambiente natural, esses genes podem conferir vantagens competitivas de sobrevivência aos fungos e bactérias uma vez que são capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos competidores de nutrientes. Porém, somado a presença natural de ARGs, o acúmulo no meio ambiente dos resíduos dos antibióticos que são utilizados na pecuária, na indústria farmacêutica e águas servidas hospitalares e residenciais, talvez sejam propulsores em longo prazo na disseminação de microrganismos resistentes (Andersson 2020). Um estudo *in silico*, realizado através da curadoria das sequências genômicas geradas pelo projeto TARA Oceans, quantificou os ARGs distribuídos globalmente nos oceanos e detectou 560 genes de resistência a 26 classes de antibióticos. Tais dados sugerem que ainda pouco sabemos sobre a prevalência e os mecanismos naturais de evolução dos ARGs em microrganismos ambientais (Cuadrat et al., 2020).

Sobre os grupos taxonômicos identificados em nossas bibliotecas do gene 16S rRNA, vale ressaltar que as actinobactérias desempenham um papel ecológico importante e desempenham papéis nos ciclos biogeoquímicos, tanto em ambientes bentônicos quanto em habitats oceânicos. Além disso, esse grupo possui importância biotecnológica devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários de importância farmacêutica (Kamala et al. 2020). Em particular, os gêneros *Streptomyces* e *Nocardioides*, que apresentaram abundância representativa em todas as nossas amostras analisadas, independente do regime de chuvas. O gênero *Streptomyces* é responsável por sintetizar mais da metade dos antibióticos atualmente comercializados, incluindo policetídeos tipo I, II e III, terpenos e alcalóides (Nepal e Wang 2018). O gênero *Nocardioides*, amplamente distribuído em vários habitats, está associada à produção de compostos de biorremediação domésticos, resíduos industriais e farmacêuticos (Zhang et al. 2014; Chen et al. 2019; Wang et al. 2020).

Em nosso estudo *in silico* sobre a abundância dos genes funcionais relacionados ao grupo das actinobactérias, constatamos vinte e seis genes aos envolvidos em duas principais vias dentro do gênero *Streptomyces*: 1) metabolismo de terpenoides e policetídeos e 2) biossíntese de outros metabólitos secundários. Não nos surpreende que em nossos achados as vias biossintéticas tenham maior correspondência com o gênero *Streptomyces*, visto que esse é o grupo de actinobactérias responsável por mais da metade dos antibióticos usados atualmente, incluindo policetídeos tipo I, II e III, terpenos e alcaloides (Nepal & Wang 2018).

No entanto, embora já esteja bem estabelecido nas últimas quatro décadas a notável capacidade de produzir compostos bioativos dos estreptomicetos, esse grupo continua a ser uma importante fonte de nova moléculas, sobretudo, no ambiente marinho. Em 2018, por exemplo, dos 240 novos produtos naturais de origem marinha, 167 novos metabólitos são atribuídos ao gênero *Streptomyces* (Carroll et al., 2020).

Em nossa triagem computacional, a via de metabolismo de terpenoides e policetídeos que encontramos pode sugerir a biossíntese de importantes produtos naturais. Dentre eles, os grupos de PN que contêm compostos halogênicos em sua estrutura química. Derivados de fenazinas terpenoides, por exemplo, são relatados com ação anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica a partir da fermentação de cepas marinhas de *Streptomyces* sp (Kasanah & Triyanto 2019). Essa via metabólica também pode ser responsável pela síntese

de produtos naturais híbridos de policetídeo-terpenoides. Ao identificarem BBCs crípticas, através de análises bioinformáticas, pesquisadores otimizaram as condições de crescimento *Streptomyces* sp. isoladas de sedimento marinho e obtiveram meroterpenoides com novas moléculas antimicrobiana e citotóxica (Shen et al., 2020).

A via metabólica de terpenos e policetídeos pode, também, estar associada a produção de compostos carotenoides. O sequenciamento do DNA de cepas de *Streptomyces* sp., por exemplo, indicou a presença de 31 grupamentos genéticos crípticos, que não são expressos em condições convencionais de cultivo. Dentre os produtos naturais sintetizados pelas regiões crípticas estão os carotenoides (Becerril et al., 2018). Essas substâncias químicas são pigmentos terpenoides comumente relacionados à organismos fotossintéticos e possuem aplicações como corantes alimentares, suplementos alimentares e farmacêuticos. Contudo a presença desses metabólitos secundários em BGCs crípticos em *Streptomyces* sp. isolado do ambiente marinho pode ser um potencial recurso para a descoberta de novos produtos naturais bioativos (Ma et al., 2020).

Dentro da via metabólica de terpenoides e policetídeos, também encontramos nove correspondências com a via de degradação de geraniol. Os micro-organismos que apresentam essa via metabólica são capazes de degradar compostos orgânicos complexos produzidos por espécies vegetais, servindo como fonte de carbono e energia para alguns grupos de bactérias e fungos. O progresso no entendimento do funcionamento das enzimas envolvidas nesse tipo de via pode auxiliar a descoberta de novas moléculas com potencial ação na área de biorremediação (Zhu et al, 2020).

Na via referente à biossíntese de outros metabólitos secundários, verificamos a presença de 4 genes correspondentes à biossíntese de estreptomicina. Esse foi o primeiro antibiótico usado para combater com sucesso a tuberculose, descoberto em 1943 (Milton Wainwright, 1991). A estreptomicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeo, possui amplo espectro de ação e atuam através da inibição de síntese proteica bactérias gram-positivas e gram-negativas (Krause et al., 2016). Apesar do impacto positivo na produção industrial à época, na década de 60, as principais classes de antibióticos utilizadas atualmente já haviam sido

descobertas, o que resultava no isolamento de compostos bioativos repetidos e o uso de aminoglicosídeo diminuiu como surgimento de outras classes de amplo espectro.

Outra via que merece destaque é a da biossíntese de fenilpropanoides. Assim como os terpenoides, os fenilpropanoides e flavonoides são metabólitos secundários mais relacionados aos vegetais. Esses compostos naturais são explorados para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos, pois, possuem ampla atividade farmacológica e baixa toxicidade. Sendo assim, investir esforços na obtenção dos metabólitos fenilpropanóide e flavonóide a partir de procariotos pode apresentar vantagens uma vez que os compostos derivados de plantas têm a sua disponibilidade limitada devido às variações sazonais e regionais e à dificuldade inerente ao isolamento (Wang et al., 2020). Espécies de estreptomicetos isoladas do sedimento marinho podem ser a alternativa para produção desse grupo de metabólitos. As enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS), presentes nas vias metabólicas para produtos derivados do ácido benzóico e da policetídeo sintase tipo III (PKS), respectivamente, são os principais catalisadores biossintéticos em montagem fenilpropanóide e flavonóide (Moore et al., 2020). Em frações purificadas do extrato produzido por *Streptomyces coelicolor*, isolado de esponja marinha, os derivados de ácido 3-fenilpropanóico clorados apresentaram promissores resultados com ação bioativa contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (Shaala et al., 2020).

Em nossos resultados, encontramos seis genes correspondentes à via para biossíntese de estilbenóide, diarilheptanoide e gingerol. Essa também é uma via biossintética mais frequente em vegetais, catalisada por enzimas PKSIII e responsáveis pela síntese de polifenóis aromáticos bioativos da classe estilbeno (Mattio et al., 2020). Produzidos sobretudo por angiosperma e gimnosperma, o Resveratrol, policetídeo produzido pela estilbeno sintase, possui ação bioativa como anti-inflamatório, anticâncer, antimicrobianos e antidiabéticos (Lim et al, 2016). No ambiente marinho, microalgas foram descritas como candidatas promissoras de homólogos do resveratrol terrestre (De Luca & Lauritano, 2020). E, com poucos relatos da síntese de resveratrol por bactérias, a análise do extrato produzido por uma cepa de estreptomicetos, isolada de terras úmidas

salgadas, indica a presença relevante do estilbeno resveratrol com as propriedades antioxidantes e antibacterianas exclusivas (Riahi et al., 2019).

Outra classe bacteriana com abundância significativa em nossa biblioteca metagenômica do gene 16S rRNA, foi Planctomycetia. Gêneros, como Blastopirellula e Termostilas são decompositores, desempenhando um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio. No entanto, esta classe taxonômica também tem sido associada à produção de terpenóides, compostos carotenóides e policetídeos (Schubert et al. 2020). Entre as bactérias do filo Proteobacteria, representantes da classe Deltaproteobacteria, como o gênero Myxococcus, possuem espécies que produzem metabólitos secundários com ação antibiótica (González-Muñoz et al. 2010; Wei et al. 2015; Jurkevitch et al. 2020). A classe Gammaproteobacteria inclui os gêneros Pseudomonas e Psychrobacter. As bactérias desses grupos têm distribuição onipresente no ambiente marinho e são dominantes na superfície do sedimento marinho (0-2 cm), apresentando pouca exigência metabólicas, facilitando o cultivo em laboratório (Bowman et al. 2005).

No ambiente marinho, o gênero Pseudomonas também pode ser um simbiótico de animais e plantas (Harada et al. 2019). Pseudomonas spp. pode abrigar em seu genoma clusters biossintéticos associados à síntese de produtos bioativos com antitumorais ação, como Pederin, e com ações antibióticas, como mupirocina (Timmermans et al. 2017; Lipko et al. 2012; Piel et al. 2004). Nos extratos produzidos a partir da fermentação de quatro cepas de Pseudomonas spp., cinco compostos químicos foram identificados, cujas fórmulas moleculares indicam que são constituintes ou participantes dos estágios de síntese de compostos da classe dos policetídeos previamente identificados em plantas, fungos e bactérias (Van den Berg 1991; Abe 2009; Nguyen et al., 2018).

Ácido orselínico, por exemplo, é um precursor bem conhecido de compostos policetídeos (Shen 2003). Os outros compostos foram 4-terc-Butilfenol, ácido triacético lactona, 5,7-Dihidroxi-2- etilcromona, Filoquinona. Os butilfenóis são comumente tóxicos e associados à contaminação industrial de águas residuais (Makhatova et al. 2019). Fontes naturais de butilfenóis incluem pelo menos 16 espécies de bactérias (incluindo cepas de Pseudomonas) e 11 espécies de fungos entre outros (Dharni et al. 2014; Zhao et al. 2019). Atividade

antibacteriana do butilfenol análogos contra bactérias multirresistentes foram descritos (Aissaoui et al. 2019). A lactona do ácido triacético é um subproduto bem conhecido das sintases de policetídeo e reconhecido como “molécula plataforma” devido ao seu potencial para síntese química de vários medicamentos e antimicrobianos (Tang et al. 2013; Obydenov et al. 2019). Análogos de cromonas naturais foram encontrados em plantas e fungos, e estão associados a antioxidantes, antimicrobianos, atividades anticâncer e anti-inflamatórias (Semwal et al. 2020). Por fim, filoquinona (vitamina K1) análogos foram sugeridos para reduzir a virulência da doença enterohemorrágica *Escherichia coli* (EHEC) (Kijewski et al. 2020).

Conclusão

Através das nossas análises metagenômicas sobre a taxonomia e abundância de bactérias do ecossistema marinho, concluímos que o sedimento marinho da praia de Lucena pode abrigar Actinobactérias do gênero *Streptomyces* com genes biossintéticos envolvidos na produção antimicrobianos. Verificamos, também, que nesse ambiente, representantes cultiváveis do filo Proteobacteria, como as pseudomonas marinhas, podem representar uma fonte promissora de policetídeos de interesse farmacêutico. Além do potencial biotecnológico atribuídos às cepas marinhas, nossos resultados sobre a presença de AGRs sugerem que mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão dos mecanismos naturais e evolutivos das bactérias quanto a presença de genes de resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe I. (2010) Engineered biosynthesis of plant polyketides: structure-based and precursor-directed approach. *Top Curr Chem* 297:45-66. doi: 10.1007/128_2009_22.

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, In: Allured Publishing Corporation, 4th ed.: Carol Stream, Illinois, 804p.

Aissaoui N, Mahjoubi M, Nas F et al (2019) Antibacterial potential of 2,4-di-tertbutylphenol and calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiol J* 36:53-62 [https:// www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2018.1503377](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2018.1503377)

AESA - Agência executiva de gestão das águas. In: <http://www.aesa.pb.gov.br/aesawebsite/meteorologia-chuvas>

Amarasiri, M., Sano, D., & Suzuki, S. (2019). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1–44. doi:10.1080/10643389.2019.1692611

Amoutzias, G., Chaliotis, A., & Mossialos, D. (2016). *Discovery Strategies of Bioactive Compounds Synthesized by Nonribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthases Derived from Marine Microbiomes. Marine Drugs*, 14(4), 80. doi:10.3390/md14040080

Andersson DI, Balaban NQ, Baquero F, Courvalin P, Glaser P, Gophna U, Kishony R, Molin S, TÃ¼njum T (2020). Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiology Reviews*, (), fuaa001–. doi:10.1093/femsre/fuaa001

Arboleda, V. A., & Xian, R. R. (2018). *An Overview of DNA Analytical Methods. Biobanking*, 385–402. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_31

Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., & Ignacimuthu, S. (2013). *Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine Streptomyces sp. AP-123 and its cytotoxic effect. Chemosphere*, 90(2), 479–487. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.08.006

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., ... van Wezel, G. P. (2015). *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. doi:10.1128/mnbr.00019-15

Baz, J. P., Cañedo, L. M., Puentes, J. L. F., & Elipe, M. V. S. (1997). *Thiocoraline, a Novel Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Micromonospora. II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. The Journal of Antibiotics*, 50(9), 738–741. doi:10.7164/antibiotics.50.738

Becerril A, Álvarez S, Braña AF, Rico S, Díaz M, Santamaría RI, Méndez C. Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *PLoS One* 2018; 13(5): e0198145

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). *What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, 98(6), 236–238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340

Bérdy, J. (2005). *Bioactive Microbial Metabolites*. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1

Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2018). *Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 35(1), 8–53. doi:10.1039/c7np00052a

Bollinger, A., Thies, S., Katzke, N., & Jaeger, K.-E. (2018). *The biotechnological potential of marine bacteria in the novel lineage of Pseudomonas pertucinogena*. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13288

Bowman JP, McCammon SA, Dann AL (2005) Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated gamma-proteobacterial clades from marine sediment. *Microb Ecol* 49(3):451-460. doi:10.1007/s00248-004-0070-2

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2010). *Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1(Suppl 1):4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107

Chen, H., & Du, L. (2015). *Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 541–557. doi:10.1007/s00253-015-7093-0

Chen J, Jiang X, Tong T, Miao S, Huang J, Xie S (2019) Sulfadiazine degradation in soils: dynamics, functional gene, antibiotic resistance genes and microbial community. *Sci Total Environ* 691:1072-1081. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.230

Comin, M., Di Camillo, B., Pizzi, C., & Vandin, F. (2020). *Comparison of microbiome samples: methods and computational challenges. Briefings in Bioinformatics.* doi:10.1093/bib/bbaa121

Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., ... Pernodet, J.-L. (2003). *Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products. Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 49–55. doi:10.1128/aem.69.1.49-55.2003

Coutinho, F. H., Gregoracci, G. B., Walter, J. M., Thompson, C. C., & Thompson, F. L. (2018). *Metagenomics Sheds Light on the Ecology of Marine Microbes and Their Viruses. Trends in Microbiology.* doi:10.1016/j.tim.2018.05.015

Crofts, T. S., Gasparri, A. J., & Dantas, G. (2017). *Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422–434. doi:10.1038/nrmicro.2017.28

Dharni S, Maurya A, Samad A et al. (2014) Purification, characterization, and in vitro activity of 2,4-di-tert-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: conformational and molecular docking studies. *J Agric Food Chem* 62(26):6138–6146 doi: 10.1021/jf5001138

De Luca, D., & Lauritano, C. (2020). *In Silico Identification of Type III PKS Chalcone and Stilbene Synthase Homologs in Marine Photosynthetic Organisms. Biology*, 9(5), 110. <https://doi.org/10.3390/biology9050110>

Desriac, F., Jégou, C., Balnois, E., Brillet, B., Chevalier, P., & Fleury, Y. (2013). *Antimicrobial Peptides from Marine Proteobacteria*. *Marine Drugs*, *11*(10), 3632–3660. doi:10.3390/md11103632

Dholakiya, R. N., Kumar, R., Mishra, A., Mody, K. H., & Jha, B. (2017). *Antibacterial and Antioxidant Activities of Novel Actinobacteria Strain Isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat*. *Frontiers in Microbiology*, *8*. doi:10.3389/fmicb.2017.02420

Drufva, E. E., Hix, E. G., & Bailey, C. B. (2020). *Site directed mutagenesis as a precision tool to enable synthetic biology with engineered modular polyketide synthases*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *5*(2), 62–80. doi:10.1016/j.synbio.2020.04.001

Duval, R. E., Grare, M., & Demoré, B. (2019). *Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria*. *Molecules*, *24*(17), 3152. doi:10.3390/molecules24173152

Erba, E., Bergamaschi, D., Ronzoni, S., Faretta, M., Taverna, S., Bonfanti, M., ... D'Incalci, M. (1999). *Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity*. *British Journal of Cancer*, *80*(7), 971–980. doi:10.1038/sj.bjc.6690451

Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). *The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles*. *Science*, *320*(5879), 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213

Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2003). *Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus Salinospora*. *ChemInform*, *34*(19). doi:10.1002/chin.200319208

Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., & Potts, B. C. (2009). *Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(6), 2175–2180. doi:10.1016/j.bmc.2008.10.075

Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2006). *Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms*. *Chemical Reviews*, *106*(8), 3468–3496. doi:10.1021/cr0503097

Fleming A (1945) Penicillum, Nobel Lecture. Nobel Prize. Org Stockholm, Sweden

Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). *Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms*. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-019-0158-9

Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2004). *The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity*. *BioScience*, *54*(8), 777. doi:10.1641/0006 3568(2004)054[0777:tuossp]2.0.co;2

Galperin, M. Y. (2013). *Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes*. *Microbiology Spectrum*, *1*(2). doi:10.1128/microbiolspectrum.tbs-0015-2012

Garrido-Cardenas, J., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J., & Manzano-Agugliaro, F. (2017). *DNA Sequencing Sensors: An Overview*. *Sensors*, *17*(3), 588. doi:10.3390/s17030588

Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). *Microbial Metagenomics: Beyond the Genome*. *Annual Review of Marine Science*, *3*(1), 347–371. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142811

Gołębiewski, M., & Tretyn, A. (2019). *Generating amplicon reads for microbial community assessment with next generation sequencing. Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14380

Gomez-Escribano, J., Alt, S., & Bibb, M. (2016). *Next Generation Sequencing of Actinobacteria for the Discovery of Novel Natural Products. Marine Drugs*, 14(4), 78. doi:10.3390/md14040078

Gong, B., Chen, S., Lan, W., Huang, Y., & Zhu, X. (2018). Antibacterial and Antitumor Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Soil in the Maowei Sea of the Southern Coast of China. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 17(4), 1339–1346.

González-Muñoz MT, Rodríguez-Navarro C, Martínez-Ruiz F, Arias JM, Merroun ML, Rodríguez-Gallego M (2010) Bacterial biomineralization: new insights from Myxococcus-induced mineral precipitation. In: Geological Society, London, Special Publications, 336(1):31–50. doi:10.1144/sp336.3

Goodfellow, M., Nouioui, I., Sanderson, R., Xie, F., & Bull, A. T. (2018). *Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils. Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1315–1332. doi:10.1007/s10482-018-1088-7

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). *Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology*, 5(10), R245–R249. doi:10.1016/s1074-5521(98)90108-9

Harada M, Ito K, Nakajima N, et al (2019) Genomic analysis of pseudomonas sp. strain sct, an iodate-reducing bacterium isolated from marine sediment, reveals a possible use for bioremediation. *G3 (Bethesda)* 9(5):1321-1329. doi:10.1534/g3.118.200978

Hertweck, C. (2009). *The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. Angewandte Chemie International Edition*, 48(26), 4688–4716. doi:10.1002/anie.200806121

Hopwood, D. A. (2004). *Cracking the Polyketide Code. PLoS Biology*, 2(2), e35. doi:10.1371/journal.pbio.0020035

Hug, J. J., Panter, F., Krug, D., & Müller, R. (2018). *Genome mining reveals uncommon alkylpyrones as type III PKS products from myxobacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. doi:10.1007/s10295-018-2105-6

Hutchinson, C. R., & Fujii, I. (1995). *Polyketide Synthase Gene Manipulation: A Structure-Function Approach in Engineering Novel Antibiotics. Annual Review of Microbiology*, 49(1), 201–238. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.001221

Jenke-Kodama, H., & Dittmann, E. (2009). *Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. Phytochemistry*, 70(15-16), 1858–1866. doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.021

Jensen LJ, Julien P, Kuhn M, von Mering C, Muller J, Doerks T, et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: D250-4

Jensen, P. R., & Fenical, W. (1994). *Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives*. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 559–584. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.003015

Jensen, P. R., Chavarria, K. L., Fenical, W., Moore, B. S., & Ziemert, N. (2013). *Challenges and triumphs to genomics-based natural product discovery*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(2), 203–209. doi:10.1007/s10295-013-1353-8

Jin, J., Zhao, Y., Guo, W., Wang, B., Wang, Y., Liu, X., & Xu, C. (2019). *Thiocoraline mediates drug resistance in MCF-7 cells via PI3K/Akt/BCRP signaling pathway*. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-019-00301-w

Jünemann, S., Kleinbölting, N., Jaenicke, S., Henke, C., Hassa, J., Nelkner, J., ... Stoye, J. (2017). *Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research*. *Journal of Biotechnology*, 261, 10–23. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.08.012

Jurkevitch E, Mitchell RJ (2020) In: *The Ecology of Predation at the Microscale*. doi:10.1007/978-3-030-45599-6

Kamala K, Sivaperumal P, Kamath SM, Thilagaraj WR, Rajaram R (2020). *Marine actinobacteria as a source for emerging biopharmaceuticals*. In: *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 2095–2105. doi:10.1002/9781119143802.ch93

Kanehisa M. The KEGG database. In 'In Silico' Simulation of Biological Processes. Novartis Foundation Symposium. 2002; 247: 91–103

Karimi, E., Ramos, M., Gonçalves, J. M. S., Xavier, J. R., Reis, M. P., & Costa, R. (2017). *Comparative Metagenomics Reveals the Distinctive Adaptive Features of the Spongia officinalis Endosymbiotic Consortium*. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02499

Karpiński TM, Adamczak A. Fucoxanthin-An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants* (Basel) 2019; 8(8): 239

Kasanah N, Triyanto T. Bioactivities of halometabolites from marine actinobacteria. *Biomolecules* 2019; 9(6):225

Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). *Introduction to the Proteobacteria*. *The Prokaryotes*, 3–37. doi:10.1007/0-387-30745-1_1

Kijewski A, Witsø IL, Iversen H et al. (2020) Vitamin K analogs influence the growth and virulence potential of enterohemorrhagic Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 86(24)e00583-20 doi:10.1128/AEM.00583-20

Kizhakkekalam, V. K., & Chakraborty, K. (2020). *Marine macroalgae-associated heterotrophic Firmicutes and Gamma-proteobacteria: prospective anti-infective agents against multidrug resistant pathogens*. *Archives of Microbiology*. doi:10.1007/s00203-019-01800-2

Kornfuehrer, T., & Eustaquio, A. (2019). *Diversification of polyketide structures via synthase engineering*. *MedChemComm*. doi:10.1039/c9md00141g

Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Khan, T. M., Chuah, L.-H., Pusparajah, P., Chan, K.-G., ... Lee, L.-H. (2017). *The Potential of Streptomyces as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, Magnaporthe oryzae (Pyricularia oryzae)*. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00003

Li, J., Wang, Y., Hao, X., Li, S., Jia, J., Guan, Y., ... Gan, M. (2019). *Broad-Spectrum Antiviral Natural Products from the Marine-Derived Penicillium sp. IMB17-046*. *Molecules*, 24(15), 2821. doi:10.3390/molecules24152821

Lira M H P, de Andrade Júnior FP, de Moraes GFQ, Macena G da S, Pereira F de O, Lima IO. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *J Essent Oil Res*. 2020; 334 32:3, 187-197 335 336 21.

Lipko IA, Kalyuzhnaya OV, Kravchenko OS et al (2012) Identification of polyketide synthase genes in genome of *Pseudomonas fluorescens* strain 28Bb-06 from freshwater sponge *Baikalospongia bacillifera*. *Mol Biol* 46: 609–611 doi.org/10.1134/ S0026893312040073

Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). *Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications*. *Molecules*, 23(4), 795. doi:10.3390/molecules23040795

Mattio LM, Catinella G, Dallavalle S, Pinto A. Stilbenoids: A natural arsenal against bacterial pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(6):336

Makhatova A, Ulykbanova G, Sadyk S et al. (2019) Degradation and mineralization of 4-tert-butylphenol in water using Fe-doped TiO₂ catalysts. *Sci Rep* 9:19284 <https://www.nature.com/articles/s41598-019-55775-7>

McCauley, E.P., Piña, I.C., Thompson, A.D (2020). *Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates. J Antibiot* 73, 504–525. doi.org/10.1038/s41429-020-0330-5

Megrian, D., Taib, N., Witwinowski, J., Beloin, C., & Gribaldo, S. (2020). *One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. Molecular Microbiology*. doi:10.1111/mmi.14469

Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mäntsälä, P., & Ylihonko, K. (1999). *An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces. FEMS Microbiology Letters*, 180(1), 1–6. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08770.x

Mojid Mondol, M. A., Shahidullah Tareq, F., Hye Kim, J., Ah Lee, M., Lee, H.-S., Seok Lee, J., ... Jae Shin, H. (2012). *New antimicrobial compounds from a marine-derived Bacillus sp. The Journal of Antibiotics*, 66(2), 89–95. doi:10.1038/ja.2012.102

Moore BS, Hertweck C, Hopke JN, Izumikawa M, Kalaitzis JA, Nilsen G, et al. Plant like Biosynthetic Pathways in Bacteria: From Benzoic Acid to Chalcone1. *J Nat Prod*. 2002; 65(12):1956-62

Minot SS, Krumm N, Greenfield NB (2015) One codex: a sensitive and accurate data platform for genomic microbial identification. In: BioRxiv <http://biorxiv.org/content/early/2015/09/28/027607>

Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2012). *IBD—what role do Proteobacteria play? Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(4), 219–230. doi:10.1038/nrgastro.2012.14

Nguyen TB, Delalande O, Rouaud I, et al (2018) Tert-Butylphenolic derivatives from *Paenibacillus odorifer* - a case of bioconversion. *Molecule* 23(8):1951 doi:10.3390/molecules23081951

Nepal KK, Wang G (2019) Streptomycetes: surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products. *Biotechnol Adv* 37(1):1- 20. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.003

Obydenov DL, Vyacheslav YS, El-Tantawy AI (2019) Triacetic acid lactone as a bioprivileged molecule in organic synthesis. *Mendeleev Commun* 29:1–10

Ogasawara, Y., Yackley, B. J., Greenberg, J. A., Rogelj, S., & Melançon, C. E. (2015). *Expanding our Understanding of Sequence-Function Relationships of Type II Polyketide Biosynthetic Gene Clusters: Bioinformatics-Guided Identification of Frankiamicin A from Frankia sp. EAN1pec. PLOS ONE, 10(4), e0121505.* doi:10.1371/journal.pone.0121505

O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. London: HM Government and the Wellcome Trust. 2016; In: https://amr-review.org/sites/271/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf

Othoum, G., Bougouffa, S., Bokhari, A., Lafi, F. F., Gojobori, T., Hirt, H., ... Essack, M. (2019). *Mining biosynthetic gene clusters in Virgibacillus genomes. BMC Genomics, 20(1).* doi:10.1186/s12864-019-6065-7

Petersen, L.-E., Kellermann, M. Y., & Schupp, P. J. (2019). *Secondary Metabolites of Marine Microbes: From Natural Products Chemistry to Chemical Ecology. YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future, 159–180. doi:10.1007/978-3-030-20389-4_8*

Piel J, Hui D, Wen G, et al (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(46):16222-16227. doi:10.1073/pnas.0405976101

Pfeifer, V., Nicholson, G. J., Ries, J., Recktenwald, J., Schefer, A. B., Shawky, R. M., ... Pelzer, S. (2001). *A Polyketide Synthase in Glycopeptide Biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 276(42), 38370–38377. doi:10.1074/jbc.m106580200*

Phelan, V. V., Liu, W.-T., Pogliano, K., & Dorrestein, P. C. (2012). Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. *Nature Chemical Biology, 8(1), 26–35. doi:10.1038/nchembio.739*

Piel, J., Butzke, D., Fusetani, N., Hui, D., Platzer, M., Wen, G., & Matsunaga, S. (2005). *Exploring the Chemistry of Uncultivated Bacterial Symbionts: Antitumor Polyketides of the Pederin Family#*. *Journal of Natural Products, 68(3), 472–479. doi:10.1021/np049612d*

Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., ... Hagström, Å. (2006). *Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. Molecular Ecology, 16(4), 867–880. doi:10.1111/j.1365-294x.2006.03189.x*

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). *Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nature Biotechnology, 35(9), 833–844.* doi:10.1038/nbt.3935

Řezanka T, Spížek J. Halogen-Containing Antibiotics From Streptomyces. *Stud Nat Prod Chem.* 2003; 29:309-353

Riahi, Khaoula; Hosni, Karim; Raies, Aly; Oliveira, Rui (2019). *Unique secondary metabolites of a <i>Streptomyces</i> strain isolated from extreme salty wetland show antioxidant and antibacterial activities. Journal of Applied Microbiology, (), jam.14428. <https://doi:10.1111/jam.14428>*

Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). *Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. International Journal of Medical Microbiology, 303(6-7), 293–297.* doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.004

Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., & Ianora, A. (2017). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine Environmental Research, 128, 58–69.* doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.002

Romero, f., espliego, f., baz, j. P., quesada, t. G. D., grávalos, d., calle, f. D. L., & fernández-puentes, j. L. (1997). *Thiocoraline, a New Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Micromonospora. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological Activities. The Journal of Antibiotics, 50(9), 734–737.* doi:10.7164/antibiotics.50.734

Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., ... Venter, J. C. (2007). *The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific*. *PLoS Biology*, 5(3), e77. doi:10.1371/journal.pbio.0050077

Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., and Matsuda, H. (2009). Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresour. Technol.* 100, 572–577. doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.046

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., ... Smith, M. (1977). *Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA*. *Nature*, 265(5596), 687–695. doi:10.1038/265687a0

Schmid, M., Grossmann, A. S., Wurst, K., & Magauer, T. (2018). *Total Synthesis of Salimabromide: A Tetracyclic Polyketide from a Marine Myxobacterium*. *Journal of the American Chemical Society*, 140(27), 8444–8447. doi:10.1021/jacs.8b06228

Schubert T, Kallscheuer N, Wiegand S, et al (2020) *Calycomorphotria hydatis* gen. Nov., sp. Nov., a novel species in the family Planctomycetaceae with conspicuous subcellular structures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113(12):1877-1887. doi:10.1007/s10482-020- 01419-0

Sharma, S., Fulke, A. B., & Chaubey, A. (2019). *Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges and future perspectives*. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(6), 1–17. doi:10.1007/s13131-018-1340-z

Shen B (2013) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7(2):285-95. doi: 10.1016/s1367-5931(03)00020-6.

Selvin, J., Sathiyarayanan, G., Lipton, A. N., Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., & Kiran, G. S. (2016). *Ketide Synthase (KS) Domain Prediction and Analysis of Iterative Type II PKS Gene in Marine Sponge-Associated Actinobacteria Producing Biosurfactants and Antimicrobial Agents*. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00063

Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen A (2020) Health benefits of chromones: common ingredients of our daily diet. *Phytoch Rev* 19:761–785 doi: 10.1016/j.mencom.2019.01.001

Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00047

Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). *Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites*. *Microbiological Research*, 167(10), 571–580. doi:10.1016/j.micres.2012.06.005

Sun, W., Zhang, F., He, L., Karthik, L., & Li, Z. (2015). *Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery*. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01048

Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., ... Alberti, A. (2015). *Structure and function of the global ocean microbiome*. *Science*, 348(6237), 1261359–1261359. doi:10.1126/science.1261359

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions*. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). *Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. Critical Reviews in Biotechnology, 1–14*. doi:10.1080/07388551.2019.1710457

Storey, M. A., Andreassend, S. K., Bracegirdle, J., Brown, A., Keyzers, R. A., Ackerley, D. F., ... Owen, J. G. (2020). *Metagenomic Exploration of the Marine Sponge Mycale hentscheli Uncovers Multiple Polyketide-Producing Bacterial Symbionts. mBio, 11(2)*. doi:10.1128/mbio.02997-19

Tang SY, Qian S, Akinterinwa O, et al (2013) Screening for enhanced triacetic acid lactone production by recombinant Escherichia coli expressing a designed triacetic acid lactone reporter. *J Am Chem Soc* 135(27):10099–10103 doi:10.1021/ja402654z

Tatusoy R, Koonin E, Lipman D. A genomic perspective on protein families. *Science* 1997; 278(5338):631-7

Timmermans ML, Paudel YP, Ross AC (2017) Investigating the biosynthesis of natural products from marine Proteobacteria: a survey of molecules and strategies. *Mar Drugs* 15(8):235. doi:10.3390/md15080235

Trindade, M., van Zyl, L. J., Navarro-Fernández, J., & Abd Elrazak, A. (2015). *Targeted metagenomics as a tool to tap into marine natural product diversity for the discovery and production of drug candidates. Frontiers in Microbiology, 6*. doi:10.3389/fmicb.2015.00890

Udwary, D. W., Zeigler, L., Asolkar, R. N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., ... Moore, B. S. (2007). *Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete Salinispora tropica. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(25), 10376–10381*. doi:10.1073/pnas.0700962104

Van den Berg AJ (1991) Biotechnology and biosynthesis of quinones. *Pharm Weekbl Sci* 26;13(2):74-7. doi: 10.1007/BF01974984.

Wainwright M. Streptomycin: Discovery and Resultant Controversy. *Hist Philos Life Sci.* 1991; 13(1):97-124.

Wang JF, Liu SS, Song ZQ, Xu TC, Liu CS, Hou YG, et al. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. *Molecules* 2020; 25(21): 5112

Wang M, Noor S, Huan R, et al (2020) Comparison of the diversity of cultured and total bacterial communities in marine sediment using culture-dependent and sequencing methods. *PeerJ* 8:e10060. doi:10.7717/peerj.10060

Wang, Q., Sun, Q., Qi, R., Wang, J., Qiu, X., Liu, Z., & Huang, J. (2019). *Effects of Lactobacillus plantarum on the intestinal morphology, intestinal barrier function and microbiota composition of suckling piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* doi:10.1111/jpn.13198

Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., & Yang, L. (2015). *Natural products from Bacillus subtilis with antimicrobial properties. Chinese Journal of Chemical Engineering, 23(4), 744–754.* doi:10.1016/j.cjche.2014.05.020

Wang, W., Shao, Z., and Cai, B. (2014). Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. *Front. Microbiol.* 5:711. doi: 10.3389/fmicb.2014.00711

Ward, A. C., & Bora, N. (2006). *Diversity and biogeography of marine actinobacteria. Current Opinion in Microbiology, 9(3), 279–286.* doi:10.1016/j.mib.2006.04.004

Wei S, Cui H, Jiang Z, Liu H, He H, Fang N (2015) Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Braz J Microbiol* 46(2):455-464. doi:10.1590/S1517-838246220140533

Wilke A, Harrison T, Wilkening J, Field D, Glass EM, Kyrpides N, Mavrommatis K, Meyer F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics* 2020; 304 13:141

(WHO). World Health Organization (2018). report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation ISBN 978-92-4-151488-0

World Health Organization (2019) <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>

Accessed november 2020

WHO - World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. In: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736> Accessed November 2020.

Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221–271.

Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N. N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F. O., ... Dubilier, N. (2006). *Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. Nature*, 443(7114), 950–955. doi:10.1038/nature05192

Yadav, G., Gokhale, R. S., & Mohanty, D. (2003). *Computational Approach for Prediction of Domain Organization and Substrate Specificity of Modular Polyketide Synthases*. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 335–363. doi:10.1016/s0022-2836(03)00232-8

Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., ... Tay, J. H. (2020). *Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109563. doi:10.1016/j.rser.2019.109563

Zhang DF, Zhong JM, Zhang XM, et al (2014) *Nocardioides nanhaiensis* sp. Nov., an actinobacterium isolated from a marine sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 8):2718-2722. doi:10.1099/ijs.0.062851-0

Zhang, J., Li, B., Qin, Y. (2020). A new abyssomicin polyketide with anti-influenza A virus activity from a marine-derived *Verrucospora* sp. MS100137. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 1533–1543. doi.org/10.1007/s00253-019-10217-2

Zhang W and Liu J. (2016) Recent Advances in Understanding and Engineering Polyketide Synthesis [version 1; peer review: 4 approved]. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev):208. doi.org/10.12688/f1000research.7326.1

Zhao F, Wang P, Lucardi RD, Su D, Li S (2020) Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins* 12:35; doi:10.3390/toxins12010035

ARTIGOS SUBMETIDOS

Antonie van Leeuwenhoek

Bacterial taxonomic diversity and identification of polyketide-producing
Pseudomonas spp. in marine sediment at Northeast Brazilian Coast

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Bacterial taxonomic diversity and identification of polyketide-producing Pseudomonas spp. in marine sediment at Northeast Brazilian Coast
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Microbiology and probiotics
Keywords:	polyketide; Pseudomonas; 16S rRNA; antibiotic-resistance
Corresponding Author:	Jose Vitor Lima-Filho, Ph.D. UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco RECIFE, Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Renata Valença Vaz
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Renata Valença Vaz
	Flávia Figueira Aburjaile
	Vânia Maria Maciel Melo
	Marcílio Martins de Moraes
	Cláudio Augusto Gomes da Câmara
	Cecília Craveiro
	Sílvio Ricardo Maurano Peixoto
	Jose Vitor Lima-Filho, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	

Funding Information:	
Abstract:	<p>Marine bacteria may represent an important source of bioactive compounds and antimicrobials. The objective of this work was to prospect microorganisms from the marine sediment using the 16S rRNA gene as a phylogenetic marker, and to cultivate polyketide-producing bacterial strains. Expeditions were conducted at Praia de Lucena, located in the metropolitan region of João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. A Van Veen dredge was used for collection of samples of marine sediment (n = 21) at depth of 10 meters from December/ 2016 to September/ 2017. Extraction of metagenomic DNA was carried out with 0.25 grams of each sample. The SC-Act-235-aS-20 and SCAct-878-aA-19 primers were used to amplify the regions between V3 to V5 of the 16S rRNA gene by PCR. After construction of the 16S rRNA library, the data analysis after sequencing was performed using One Codex platform. One sample of marine sediment was selected for bacterial culture in laboratory. Gas chromatography-mass spectrometry was used for identification of compounds of polyketide class. The results showed greater abundance of the phyla Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria in the samples, including genera of bacteria associated with production of bioactives, such as: Nocardioideis, Streptomyces, Blastopirellula and, Myxococcus . Four polyketide-producing Pseudomonas spp. were identified. The mass spectra obtained from fermented extracts led to identification of a polyketide metabolic</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>precursor: Orselinic acid; and four chemical compounds of the polyketide class: 4-tertButylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone, Phylloquinone. We conclude that marine Pseudomonas strains represent a rich source of polyketides of pharmaceutical interest.</p>
--	--

Powered by Editioal Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Cover Letter

[Click here to access/download;Cover Letter;Cover letter artigo 14.02.21_oficial.docx](#)

Dear Editor,

In this study, we investigate microorganisms from marine sediment at Northeast Brazilian Coast using the 16S rRNA gene as a phylogenetic marker, and cultivate *Pseudomonas* spp. strains for identification of chemical compounds of the polyketide class. The results showed greater abundance of the phyla Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria in the samples, including genera of bacteria associated with production of bioactives, such as: *Nocardioides*, *Streptomyces*, *Blastopirellula* and, *Myxococcus*. Four *Pseudomonas* isolates were cultured in laboratory. The mass spectra obtained from extracts led to identification of a precursor chemical compound of the polyketide metabolic pathway: Orselinic acid; and four chemical compounds of the polyketide class:

4-tert-Butylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone, Phylloquinone. The data is discussed in light of previous studies. We declare that all authors are aware of this manuscript submission, which was not previously submitted to any other journal. The authors declare no conflict of interest. Thus, we ask you for the opportunity to have our work evaluated by reviewers and possibly published in this important journal.

Sincerely,

José Vitor Moreira Lima-Filho

Full Professor, Federal Rural University of Pernambuco, Brazil

Manuscript

[Click here to access/download;Manuscript;artigo](#)

[AVLeveenhook_ 14.02.21_oficial.docx](#) [Click here to view linked References](#)

Abstract

Marine bacteria may represent an important source of bioactive compounds and antimicrobials. The objective of this work was to prospect microorganisms from the marine sediment using the 16S rRNA gene as a phylogenetic marker, and to cultivate polyketide-producing bacterial strains. Expeditions were conducted at Praia de Lucena, located in the metropolitan region of João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. A Van Veen dredge was used for collection of samples of marine sediment (n = 21) at depth of 10 meters from December/ 2016 to September/ 2017. Extraction of metagenomic DNA was carried out with 0.25 grams of each sample. The SC-Act-235-aS-20 and S-CAct-878-aA19 primers were used to amplify the regions between V3 to V5 of the 16S rRNA gene by PCR. After construction of the 16S rRNA library, the data analysis after sequencing was performed using One Codex platform. One sample of marine sediment was selected for bacterial culture in laboratory. Gas chromatography-mass spectrometry was used for identification of compounds of polyketide class. The results showed greater abundance of the phyla Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria in the samples, including genera of bacteria associated with production of bioactives, such as: *Nocardioides*, *Streptomyces*, *Blastopirellula* and, *Myxococcus*. Four polyketide-producing *Pseudomonas* spp. were identified. The mass spectra obtained from fermented extracts led to identification of a polyketide metabolic precursor: Orselinic acid; and four chemical compounds of the polyketide class: 4-tert-Butylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone, Phylloquinone. We conclude that marine *Pseudomonas* strains represent a rich source of polyketides of pharmaceutical interest.

Keywords: polyketide, *Pseudomonas*, 16S rRNA, antibiotic-resistance.

1. Introduction

For more than half a century, laboratory cultivation of microorganisms from the terrestrial soil have been a basis for discovery and development of novel drugs. However, 70% of the Earth's surface is occupied by oceans and therefore it is clear that there is still much to be explored regarding the ecological, chemical and biotechnological potential in the marine ecosystem (Romano et al 2017). For example, it was estimated that only 1% of microorganisms in the marine environment can be easily cultivable in laboratories (Amoutzias et al. 2016). The main challenges in the study of the marine ecosystem are related to the reproducibility of its dynamic nature (climate, salinity and currents of water bodies). Nevertheless, in 2016, 179 bioactive compounds produced marine bacteria were identified (Blunt et al. 2018). In addition to these efforts, metagenomics and massive sequencing technologies were shown capable of accessing biochemical pathways and genes with biotechnological potential in little explored environments such as the oceans (Blunt et al. 2018; Petersen et al. 2019).

Among compounds of interest to the pharmaceutical industry, those of the polyketide class represent an important structural basis for metabolites with biotechnological potential. For example, the antibiotic Erythromycin, the antifungal Amphotericin B and the antiparasitic Avermectin are examples of the known use of this class of metabolites (Kornfuehrer and Eustaquio 2019). Compounds of the polyketide class have multiple β -hydroxy ketone or β -hydroxyaldehyde functions and can be synthesized by plants, fungi and bacteria. The polyketide metabolites synthesized by microorganisms, have high structural diversity and have an irregular distribution among the producing species. The biosynthesis of polyketides is similar to that of fatty acids in terms of the precursors involved in the reaction and the chemical components used in the extension of the carbon skeleton. The chemical structure of this compound is the result of an assembly line oriented by enzymes called Polyketetide Synthase (PKS) (Hopwood 2004; Hertweck 2009).

The goal of this study was to screening microorganisms from the marine sediment, using the 16S rRNA gene as a phylogenetic marker, and to cultivate strains that produce compounds of the polyketide class.

2. Material and Methods

2.1 Collection of marine sediments

Expeditions were conducted at Praia de Lucena, located in the metropolitan region of João Pessoa, State of Paraíba, Brazil (Table 1, Supplementary). A Van Veen dredge was used for collection of samples of marine sediment ($n = 21$) at depth of 10 meters from December/2017 to September/2018. Information on temperature, salinity and pH of the interstitial water were collected with multiparameter analyzer (Hanna-Y). The samples were stored in sterile containers at 4 °C and processed in the Laboratory of Microbiology and Immunology (LAMIM-UFRPE) of the Federal Rural University of Pernambuco.

2.2 Extraction of metagenomic DNA

All samples were centrifuged (5000 g/ 10 min) to remove the interstitial water. Extraction of metagenomic DNA carried out with 0.25 grams of each sample, according to the manufactures instructions (Kit Power Soil™ DNA Isolation, MoBio, Carlsbad, CA, USA). The concentration and purity of the metagenomic DNA were determined with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Minnesota, USA).

DNA integrity was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gel, developed with SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA), and visualized in a photodocumentation system with UV light. Metagenomic DNA was stored at -20 °C until use.

2.3 Amplification of the 16S rRNA gene from metagenomic DNA

Metagenomic DNA of samples collected in the same month were pooled. The primers SC-Act-235-aS-20 and S-CAct-878-aA-19 were used to amplify the regions between V3 to V5 of the 16S rRNA gene by PCR (Stach 2003). All oligonucleotides used in this study with their sequences and references are listed in Table 1. The following parameters were used for each 25 µL reaction: 30 ng/µL of the metagenomic DNA, 5 µL of the Go Taq G2 buffer (5x), 0.5 µL of dNTP's (10 mM), 2.5 µL of each primer (5.0 µM), 0.2 µL of the enzyme Go Taq G2 Hot Start 5x (Promega, Madison , WI, USA) and 7.3 µL of ultrapure water. The reaction steps were: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles with denaturation at 95 °C for 45 sec, annealing at 60 °C for 45 sec and extension at 72

°C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR was performed with Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). An electrophoresis was performed on 1% agarose gel developed with SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA). The generated amplicon was visualized in a photodocumentation system with UV light. PCR products were stored at -20 ° C.

2.4 Construction of the 16S rRNA library

The libraries were assembled in two stages, according to the specifications described by the custom protocol of the NexteraXT kit (Illumina, San Diego, CA). Firstly, the primers 515F-XT and 806RTX were used for amplification of the V4 region of the 16S rRNA gene by PCR (Caporaso et al, 2012) (Table 1). The following parameters were used for each 25 µL reaction: 30 ng/ µL of the metagenomic DNA, 6 µL of the Go Taq G2 buffer (5x), 3.6 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.6 µL of dNTP's (10 mM), 0.75 µL of each primer (5.0 µM), 0.2 µL of the enzyme Go Taq G2 Hot Start 5x (Promega, Madison, WI, USA) and 17.1 µL of water ultrapure. The reaction steps were: initial denaturation at 95°C for 3 min, 35 cycles with denaturation at 98 °C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec and extension at 72 °C for 45 sec, and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR was performed in a Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). An electrophoresis was performed in a 2% agarose gel developed with SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA). The amplicons were visualized in a photo-documentation system with UV light. Secondly, the amplicons were purified by the AMPure XP beads kit, according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter). The following parameters were used for construction of the library: 5 µL of the purified PCR product, 5 µL of the Nextera XT index primer N7xx, 5 µL of the Nextera XT index primer S5xx, 25 µL of the 2x KAPA HiFi HotStart Ready and 10 µL of ultrapure water. The reaction steps were: initial denaturation at 95 °C for 3 min, 8 cycles with denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55v°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec, and a final extension at 72°C for 5 min. Finally, the concentration of the amplicon libraries was estimated through fluorescence spectroscopy, using the dsDNA BR Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The libraries were normalized and used for metagenomic sequencing at the Genomic Center of the Federal University of Ceará at Nucleus for Research and Development of Medicines – NPDM, with MiSeq

System (Illumina, San Diego, CA) using the MiSeq Reagent Kit V2 (300 cycles), according to the manufacturer's specifications (Illumina, San Diego, CA).

2.5 Metagenomic analysis

The analysis of the data generated after sequencing was performed using a One Codex platform, as described by Minot and Geenfield (2015). Taxonomic groups were grouped using the taxonomic classification algorithm (k-mer = 31) according to their abundance in each of the sequenced samples. Comparisons of microbial abundance and diversity were conducted between samples collected during dry season (December/2016, January and February/2017) and rainfall period (April, May and June/2017) of the year.

Precipitation data were obtained from the Water Management Executive Agency (AESA) (Table 2, Supplementary).

2.6 Screening of antimicrobial-producing culturable bacteria from marine sediment

2.6.1 Isolation of bacteria from marine sediment

Samples of marine sediment collected in September/2017 (dry season) were weighed (25 g) and mixed to 225 mL of artificial seawater (15.15 g NaCl; 2.18 g MgCl₂·6H₂O; 2.85 g MgSO₄·7H₂O; 0.65 g CaCl₂; 0.116 g NaHCO₃; 0.414 g KCl; 1L distilled H₂O). After 30 minutes, serial dilutions were prepared and aliquots of each dilution were added by spread-plate on starch nitrate agar (20 g soluble starch; 1g KNO₃; 0.5g K₂HPO₄; 0.5 g MgSO₄·7H₂O; 0.5 g NaCl; 15 g agar; 1 L distilled H₂O). The plates were incubated at 28 °C for up to 7 days. After incubation, colonies with different morphological profiles were selected to perform DNA extraction and molecular identification through sequencing.

2.6.2 Identification of the bacterial strains at species level

The identification of bacterial isolates was carried out by sequencing the conserved regions of the bacterial rRNA 16S gene. The isolates were grown overnight on Brain heart infusion agar (BHI) at room temperature. Five colonies were pick and dissolved in 500 µl ultrapure water in plastic sterile microtubes. The microtubes were let in dry bath at 100 °C for 11 minutes, and then to an ice bath for 4 minutes. The samples were

centrifuged at 14000 rpm for 2 minutes and the supernatant containing the DNA was transferred to a new microtube. The confirmation of the extraction was carried out by electrophoresis on a 1% agarose gel developed with the SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA). The quantification and purity of the DNA obtained were measured by the absorbance of 260nm (A260) by a spectrophotometer - Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Minnesota, USA). The amplification of the 16S rRNA gene was performed using the universal primers 27F and 1525R (Lane 1991) (Table 1). PCR reactions were performed with the following parameters: 30 ng of metagenomic DNA, 12.5 µL of the MyTaq RedMix Kit (Bioline, Meridian Bioscience, USA), 2.5 µL of each primer, each at 10 µM and 4, 5 µL of ultrapure water. The reaction steps were: initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, 30 cycles with denaturation at 95 °C for 45 sec, annealing at 55 °C for 45 sec and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR was performed in the Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Electrophoresis was performed in 1% agarose gel developed with SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA). After amplification of the 16S rRNA gene, the PCR products were submitted for sequencing at the company MacroGen (<http://www.macrogen>).

2.7 Fermentation and extraction of extracellular metabolites

The fermentation process was adapted from the methodology of Penesyán et al. (2011). Five colonies were mixed to sterile phosphate saline (optical density = 1.0; 600 nm) and then added to 50 mL of sea broth: Peptone 5g, Yeast Extract 1g, $C_6H_5FeO_7$ 0.1g, NaCl 19.45 g ; $MgCl_2$ 5.9 g; $MgSO_4$ 3.24 g; $CaCl_2$ 1.8 g; KCl 0.55 g; 2 $NaHCO_3$ 0.16 g; 1 L distilled H_2O) and incubated overnight at 28 °C. Then, the pre-inoculum was added to 500 mL of sea broth and incubated at 28 °C for 10 days. After this period, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 10 °C. The supernatant (500 mL) was washed three times with ethyl acetate solvent (150, 100 and 50 mL) with a separating funnel. Then, the extract was concentrated on a rotary evaporator and its chemical profile evaluated by HPLC in the Organic and Agricultural Chemistry Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco.

2.7.1 GC-MS Analysis

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (220-MS IT GC, Varian, Walnut

Creek, CA, USA) was performed in a system with selective mass detector, a fused silica DB-5 non-polar capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) (J & W Scientific). Temperature was set from 60 to 240 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. The injector and detector temperatures were 260 $^{\circ}\text{C}$. The mass spectrometer was programmed in EI 70 eV with a scanning interval of 0.5 s and fragments from 40 to 550 Da, equipped with the same column and temperature program of the experiments GC-FID. The following parameters were used: carrier gas = helium; flow rate = 1 mL min^{-1} ; split mode (1:30); injected volume = 1 μL of diluted solution (1/100) of oil in n-hexane. The amount of each compound was calculated from the peak areas of GC-MS following the order of elution of the DB-5 column, and expressed as a relative percentage of the total area of the chromatograms. Compound identification was based on GC-MS retention indexes and computer comparison with the GC-MS data system's mass spectral library (NIST 14) and published mass spectra (Adams 2007).

3. Results

Our data showed a stability in several physicochemical parameters in the interstitial water, regardless of the rainfall regimen in the marine sediment collection area.

For instance, the temperature ranged from 28 $^{\circ}\text{C}$ to 30 $^{\circ}\text{C}$ in the dry season and 27 $^{\circ}\text{C}$ and 29 $^{\circ}\text{C}$ in the rainfall season. The pH varied between 7.4 and 8.5 in the dry season and between 7.6 and 8.5 in the rainy period. In addition, salinity varied between 41.3 and 42.5 ppt during dry season and 37.3 and 41.2 ppt in the rainfall season. All physicochemical parameters are listed in Table 2.

Metagenomic analysis revealed the following bacterial phyla in marine sediment samples: Verrucomicrobia, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes and

Proteobacteria. The most abundant phyla were Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria in both the dry and rainfall seasons (Fig. 1). The distribution of the eleven classes identified did not varied with the rainfall regimens. The most abundant classes were Actinobacteria, Planctomycetia, Deltaproteobacteria (Fig. 1). Twenty-four bacterial genera were identified, among them: *Ilumatobacter*, *Nocardioides*, *Streptomyces*, *blastopirellula*, *Pirellula*, *Thermostilla*, *Myxococcus*, *Pseudomonas*, *Racemicystis*, *Sandaracinus*. Table 3 shows the most prevalent taxonomic groups among all marine sediment samples.

Fig. 2 shows bacterial genera identified in marine sediment samples used for culture of polyketide-producing strains. Although taxonomic diversity were similar to those of other sediment samples, only nine isolates belonging to phylum Proteobacteria (Class Gammaproteobacteria) were obtained after culture in laboratory. After sequencing of the 16S rRNA gene and comparison of sequences with the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), we confirmed that seven isolates belonged to the genus *Pseudomonas* and two isolates to the genus *Psychrobacter* (Table 4).

However, only isolates 3 and 9 were identified at species level: *Pseudomonas putida* and *Psychrobacter piscatorii*. Four of the isolates belonging to the genus *Pseudomonas* spp. (1, 2, 6 and 8) were analyzed for their potential to synthesize compounds of the polyketide class, after fermentation and extraction of extracellular secondary metabolites. The mass spectra obtained, whose peaks of the chromatograms are shown in Fig. 3, demonstrated the identification of a precursor chemical compound of the polyketide metabolic pathway:

Orselinic acid; and four chemical compounds of the polyketide class: 4-tert-Butylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2-ethylchromone, Phylloquinone (Table 5).

4. Discussion

The metagenomic analysis did not show differences in the abundance of the phyla Actinobacteria, Planctomycetes and Proteobacteria among samples collected in the rainy or dry period. However, in the rainy months, when the average rainfall observed on the northern coast of the State of Paraíba was 174.9 ± 7.6 mm, there was a greater abundance of the phylum Proteobacteria in relation to the other phyla. The bacteria in this group are associated with the intestinal microbiota in terrestrial biomes, so that their greater abundance may reflect the anthropogenic action and environmental pollution in the region (Chen et al. 2019).

Among the taxonomic groups identified, it is worth mentioning that marine actinobacteria play an important ecological role and play roles in biogeochemical cycles, both in benthic environments and in ocean habitats. In addition, they have biotechnological importance due to their ability to produce secondary metabolites of pharmaceutical importance (Kamala et al. 2020). In particular, the genera *Streptomyces*

and Nocardioideae showed representative abundance in all samples analyzed, regardless of the rainfall regime. The genus *Streptomyces* is responsible for more than half of the antibiotics currently commercialized, including polyketides type I, II and III, terpenes and alkaloids (Nepal and Wang 2018). The genus *Nocardioideae*, widely distributed in several habitats, is associated with the production of bioremediation compounds from domestic, industrial and pharmaceutical waste (Zhang et al. 2014; Chen et al. 2019; Wang et al. 2020).

Marine bacteria of the Planctomycetia class, such as *Blastopirellula* and *Thermostilla* are decomposers, playing an important role in carbon and nitrogen cycling. However, this taxonomic class has also been associated with the production of terpenoid, carotenoid and polyketide compounds (Schubert et al. 2020). Among the bacteria of the phylum Proteobacteria, representatives of the Deltaproteobacteria class, such as the genus

Myxococcus, have species that produce secondary metabolites with antibiotic actions

(González-Muñoz et al. 2010; Wei et al. 2015; Jurkevitch et al. 2020). The

Gammaproteobacteria class includes the genera *Pseudomonas* and *Psychrobacter*. Bacteria from these groups have ubiquitous distribution in the marine environment and are dominant on the surface of the marine sediment (0–2 cm), presenting undemanding metabolic characteristics that facilitate laboratory cultivation (Bowman et al. 2005).

In the marine environment, the genus *Pseudomonas* can also be a symbiotic of animals and plants (Harada et al. 2019). *Pseudomonas* spp. may harbor in their genome biosynthetic clusters associated with the synthesis of bioactive products with antitumor action, such as Pederin, and with antibiotic actions, such as mupirocin (Timmermans et al. 2017; Lipko et al. 2012; Piel et al. 2004). In the extracts produced from the fermentation of four strains of *Pseudomonas* spp., five chemical compounds were identified, whose molecular formulas indicate they are constituents or participants in the synthesis stages of compounds of the class of polyketides previously identified in plants, fungi and bacteria (Van den Berg 1991; Abe 2009; Nguyen et al., 2018). Orselinic acid, for example, is a well-known precursor to polyketide compounds (Shen 2003). The other compounds were 4-tert-Butylphenol, Triacetic acid lactone, 5,7-Dihydroxy-2ethylchromone, Phylloquinone.

Butylphenols are commonly toxic and associated to industrial contamination of wastewaters (Makhatova et al. 2019). Natural sources of butylphenols include at least 16 species of bacteria ((including *Pseudomonas* strains) and 11 species of fungi among others (Dharni et al. 2014; Zhao et al. 2019). Antibacterial activity of butylphenol analogues against multidrug resistant bacteria have been described (Aissaoui et al. 2019). Triacetic acid lactone is a well known byproduct of polyketide synthases and recognized as “platform molecule” due to its potential for chemical synthesis of several drugs and antimicrobials (Tang et al. 2013; Obydenov et al. 2019). Natural chromones analogues have been found in plants and fungi, and are anti-oxidant, associated to antimicrobial, anticancer and anti-inflammatory activities (Semwal et al. 2020). Finally, phylloquinone

(vitamin K₁) analogues were suggested to reduce virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) (Kijewski et al. 2020).

Taken the data together, we conclude that massive sequencing of metagenomic DNA was a useful tool for taxonomic identification of bacteria in marine sediment, driving the investigation of polyketide-producing *Pseudomonas* strains of pharmaceutical interest.

Funding

This study was funded by FACEPE – Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (Grant number: IBPG-0561-2.12/15), Brazil, which provided a Scholarship to PhD student R.V. Vaz. CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior, which provided funding for consumables through PROAP/Renorbio.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

5. References

- Abe I. (2010) Engineered biosynthesis of plant polyketides: structure-based and precursor-directed approach. *Top Curr Chem* 297:45-66. doi: 10.1007/128_2009_22.
- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, In: Allured Publishing Corporation, 4th ed.: Carol Stream, Illinois, 804p.
- AESA - Agência executiva de gestão das águas. In: <http://www.aesa.pb.gov.br/aesawebsite/meteorologia-chuvas>
- Aissaoui N, Mahjoubi M, Nas F et al (2019) Antibacterial potential of 2,4-di-tertbutylphenol and calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiol J* 36:53-62 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2018.1503377>
- Amoutzias GD, Chaliotis A, Mossialos D (2016) Discovery strategies of bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-i polyketide synthases derived from marine microbiomes. *Mar Drugs* 14(4):80. doi:10.3390/md14040080
- Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR (2018) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 35(1):8-53. doi:10.1039/c7np00052a
- Bowman JP, McCammon SA, Dann AL (2005) Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated gamma-proteobacterial clades from marine sediment. *Microb Ecol* 49(3):451-460. doi:10.1007/s00248-004-0070-2
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1(Suppl 1):4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
- Chen J, Jiang X, Tong T, Miao S, Huang J, Xie S (2019) Sulfadiazine degradation in soils: dynamics, functional gene, antibiotic resistance genes and microbial community. *Sci Total Environ* 691:1072-1081. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.230
- Dharni S, Maurya A, Samad A et al. (2014) Purification, characterization, and in vitro activity of 2,4-di-tert-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: conformational and molecular docking studies. *J Agric Food Chem* 62(26):6138–6146 doi: 10.1021/jf5001138
- González-Muñoz MT, Rodríguez-Navarro C, Martínez-Ruiz F, Arias JM, Merroun ML, Rodríguez-Gallego M (2010) Bacterial biomineralization: new insights from

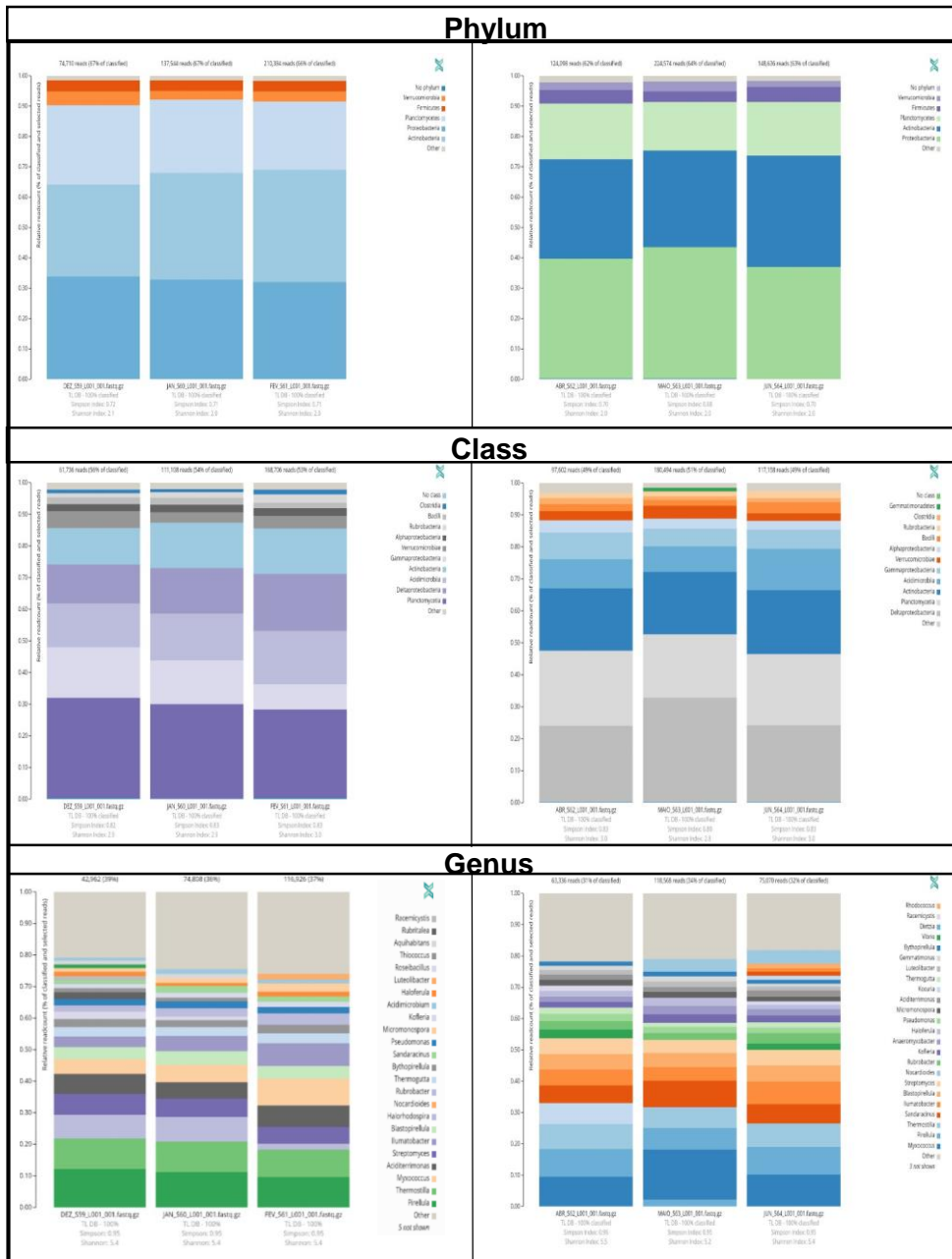
- Myxococcus*-induced mineral precipitation. In: Geological Society, London, Special Publications, 336(1):31–50. doi:10.1144/sp336.3
- Harada M, Ito K, Nakajima N, et al (2019) Genomic analysis of *pseudomonas* sp. strain sct, an iodate-reducing bacterium isolated from marine sediment, reveals a possible use for bioremediation. *G3 (Bethesda)* 9(5):1321-1329. doi:10.1534/g3.118.200978
- Hertweck C (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(26):4688-4716. doi:10.1002/anie.200806121
- Hopwood DA (2004) Cracking the polyketide code. *PLoS Biol* 2(2):E35. doi:10.1371/journal.pbio.0020035
- Jurkevitch E, Mitchell RJ (2020) In: The Ecology of Predation at the Microscale. doi:10.1007/978-3-030-45599-6
- Kamala K, Sivaperumal P, Kamath SM, Thilagaraj WR, Rajaram R (2020). Marine actinobacteria as a source for emerging biopharmaceuticals. In: Encyclopedia of Marine Biotechnology, 2095–2105. doi:10.1002/9781119143802.ch93
- Kijewski A, Witsø IL, Iversen H et al. (2020) Vitamin K analogs influence the growth and virulence potential of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 86(24)e00583-20 doi:10.1128/AEM.00583-20
- Kornfuehrer T, Eustáquio AS (2019) Diversification of polyketide structures *via* synthase engineering. *Medchemcomm* 10(8):1256-1272. doi:10.1039/c9md00141g
- Lane DJ (1991) 16S/ 23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, United Kingdom: Wiley and Sons Ltd, p. 115–175.
- Lipko IA, Kalyuzhnaya OV, Kravchenko OS et al (2012) Identification of polyketide synthase genes in genome of *Pseudomonas fluorescens* strain 28Bb-06 from freshwater sponge *Baikalospongia bacillifera*. *Mol Biol* 46: 609–611 doi.org/10.1134/S0026893312040073
- Makhatova A, Ulykbanova G, Sadyk S et al. (2019) Degradation and mineralization of 4-tert-butylphenol in water using Fe-doped TiO₂ catalysts. *Sci Rep* 9:19284 <https://www.nature.com/articles/s41598-019-55775-7>
- Minot SS, Krumm N, Greenfield NB (2015) One codex: a sensitive and accurate data platform for genomic microbial identification. In: *BioRxiv* <http://biorxiv.org/content/early/2015/09/28/027607>

- Nepal KK, Wang G (2019) Streptomycetes: surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products. *Biotechnol Adv* 37(1):1-20. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.003
- Nguyen TB, Delalande O, Rouaud I, et al (2018) Tert-Butylphenolic derivatives from *Paenibacillus odorifer* - a case of bioconversion. *Molecule* 23(8):1951 doi:10.3390/molecules23081951
- Obydenov DL, Vyacheslav YS, El-Tantawy AI (2019) Triacetic acid lactone as a bioprivileged molecule in organic synthesis. *Mendeleev Commun* 29:1–10
- Penesyan A, Tebben J, Lee M, et al (2011) Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. *Mar Drugs* 9(8):1391-1402. doi:10.3390/md9081391
- Petersen LE, Kellermann MY, Schupp PJ (2019) Secondary metabolites of marine microbes: from natural products chemistry to chemical ecology. In: *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future* 159–180. doi:10.1007/978-3-030-20389-4_8
- Piel J, Hui D, Wen G, et al (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(46):16222-16227. doi:10.1073/pnas.0405976101
- Romano G., Costantini M, Sansone C et al. (2017). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine Environ Res* 128:58–69. doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.002
- Schubert T, Kallscheuer N, Wiegand S, et al (2020) *Calycomorphotria hydatis* gen. Nov., sp. Nov., a novel species in the family Planctomycetaceae with conspicuous subcellular structures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113(12):1877-1887. doi:10.1007/s10482-020-01419-0
- Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen A (2020) Health benefits of chromones: common ingredients of our daily diet. *Phytoch Rev* 19:761–785 doi: 10.1016/j.mencom.2019.01.001
- Shen B (2013) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7(2):285-95. doi: 10.1016/s1367-5931(03)00020-6.
- Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol* 5(10):828-841. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x

- Tang SY, Qian S, Akinterinwa O, et al (2013) Screening for enhanced triacetic acid lactone production by recombinant *Escherichia coli* expressing a designed triacetic acid lactone reporter. *J Am Chem Soc* 135(27):10099–10103 doi:10.1021/ja402654z
- Timmermans ML, Paudel YP, Ross AC (2017) Investigating the biosynthesis of natural products from marine Proteobacteria: a survey of molecules and strategies. *Mar Drugs* 15(8):235. doi:10.3390/md15080235
- Van den Berg AJ (1991) Biotechnology and biosynthesis of quinones. *Pharm Weekbl Sci* 26;13(2):74-7. doi: 10.1007/BF01974984.
- Wang M, Noor S, Huan R, et al (2020) Comparison of the diversity of cultured and total bacterial communities in marine sediment using culture-dependent and sequencing methods. *PeerJ* 8:e10060. doi:10.7717/peerj.10060
- Wei S, Cui H, Jiang Z, Liu H, He H, Fang N (2015) Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Braz J Microbiol* 46(2):455-464. doi:10.1590/S1517-838246220140533
- Zhang DF, Zhong JM, Zhang XM, et al (2014) *Nocardioides nanhaiensis* sp. Nov., an actinobacterium isolated from a marine sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 8):2718-2722. doi:10.1099/ijs.0.062851-0
- Zhao F, Wang P, Lucardi RD, Su D, Li S (2020) Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins* 12:35; doi:10.3390/toxins120100

DRY SEASON

RAINFALL SEASON



[Click here to access/download;Figure;Fig. 1_13.02.21_oficial_genero_filo_classe.docx](#)

Fig. 1. Abundance and diversity of bacterial groups in marine sediment samples.

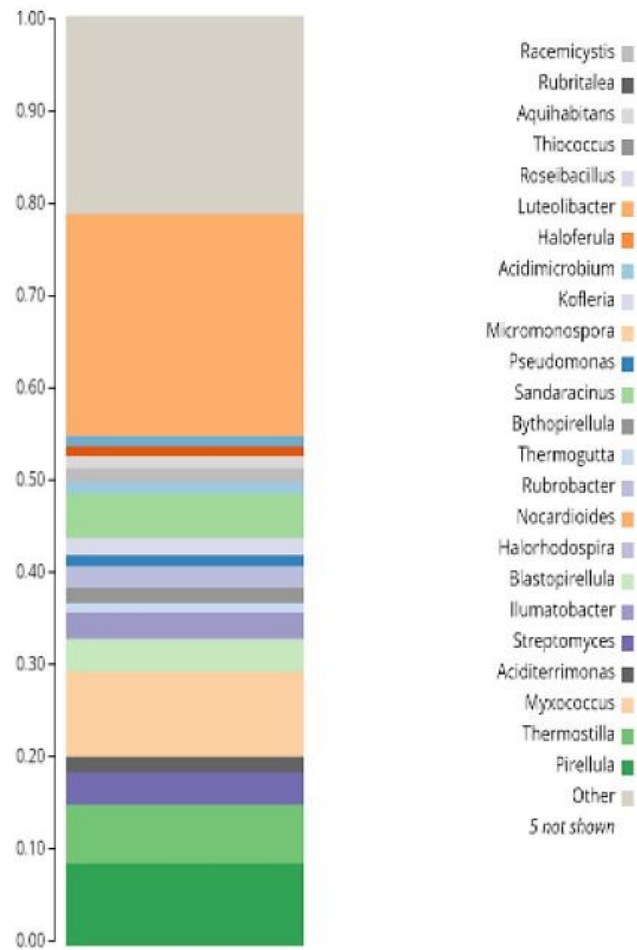


Fig. 2. Genus of bacteria identified by 16S rRNA gene in samples of sediment used for culture of polyketide-producing strains.

[Click here to access/download;Figure;Fig. 3. cromatogramas.docx](#)

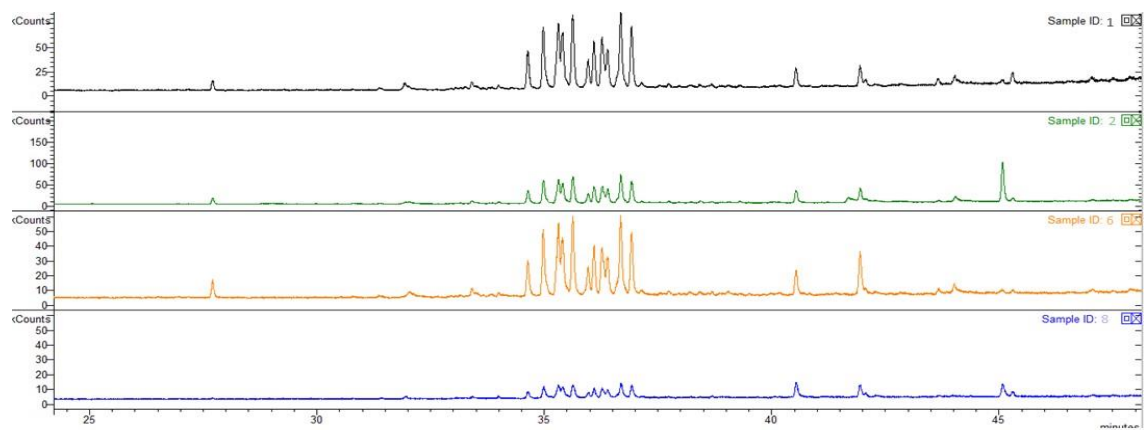


Fig. 3. Cromatogramas das amostras analisadas.

[Click here to access/download;Table 1_13.02.21_oficial primers.docx](#)

Table 1. Oligonucleotides used in the study.

S-C-Act-235-a-S-20	5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTTG - 3'	Stach, 2003
S-CAct-878-a-A-19	5'- CCGTACTCCCCAGGCGGGG - 3'	Stach, 2003
515F-XT	5'- GCCAGCMGCCGCGGTAA - 3'	Caporaso et al., 2012
Região específica ao index	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGT – 3'	
806R-TX	5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3'	Caporaso et al., 2012
Região específica ao index	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	
27F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'	Lane, 1991
1525R	5'- AAGGAGGTGWTCCARCC - 3'	Lane, 1991

Symbols for degenerated primers according to IUPAC: M = A; C, H = A, C; T, V = A, C; G, W = A or T.

Table 2. Physicochemical parameters in the interstitial water in the marine sediment collection area.

Date	Time h/min	Temperature °C	pH	OD %	OD mg/L	Conductivity μS/cm	TDS ppt	Salinity ppt
Dec - 2016	09:47	28.68	7.45	51.2	2.96	56220	29.22	41.32
Jan - 2017	11:37	30.57	7.86	55.5	3.32	63300	31.65	42.52
Feb - 2017	06:13	28.15	8.51	39.5	2.45	62010	31.01	41.64
Apr - 2017	07:54	29.11	8.53	37.9	2.33	61610	30.8	41.29
May - 2017	06:43	28.61	7.62	42.7	3.16	59890	30.9	39.9
Jun - 2017	10:31	27.41	8.59	48.2	3.12	56300	28.15	37.34

Footnote: OD% - Percentage of oxygen saturation; OD (mg/L) - Dissolved oxygen; ppt - part per thousand.

Table 3. Prevalent taxonomic bacterial groups identified through 16S rRNA gene analyses in marine sediments.

Phylum	Class	Genus
		<i>Ilumatobacter</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i>
		<i>Streptomyces</i>
		<i>Blastopirellula</i>
Planctomycetos	Planctomycetia	<i>Pirellula</i>
		<i>Thermostilla</i>
		<i>Myxococcus</i>
Proteobacteria	Delta proteobacteria	<i>Racemicystis</i>
		<i>Sandaracinus</i>
		Gammaproteobacteria

Table 4. Bacterial identification at genus level based on 16S rRNA gene sequence analysis.

Isolate	Quality (%)	Base pairs	Genus	Identity (%)	Coverage (%)	Access number
1	96.80	1419	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.86	100	MH703512.1
2	89.10	1280	<i>Pseudomonas</i> ssp.	98.28	100	MK414950.1
3	97.30	1349		99.93	100	MK537387.1
			<i>Pseudomonas putida</i>			
4	85.30	558	<i>Psychrobacter</i> ssp.	99.28	100	MK398101.1
5	75.20	827	<i>Pseudomonas</i> ssp.	98.89	97	MK332581.1
6	95.50	933	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.89	100	MK590418.1
7	93.30	1337	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.85	100	MG757952.1
8	76.40	699	<i>Pseudomonas</i> ssp.	99.14	100	KX817891.1
9	95.30	1474	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	99.86	100	AB688097.1

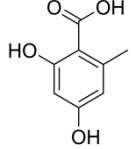
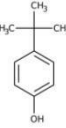
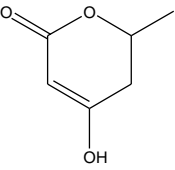
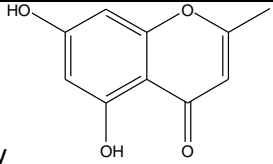
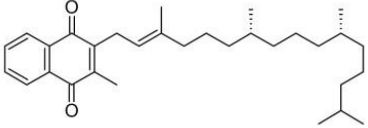
Tempo de Retenção	Compostos	Formula molecular	Amostra 1 (%)	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 8
32.015	 Orselinic acid	C ₈ H ₈ O ₄	1.39	1.00	3.91	0.67
34.995	 4-tert-Butylphenol	C ₁₀ H ₁₄ O	8.78	8.16	7.99	8.12
35.609	 Triacetic acid lactone	C ₆ H ₆ O ₃	12.39	11.89	13.24	13.90
36.709	 5,7-Dihydroxy 2-ethylchromone	C ₁₀ H ₈ O	13.15	14.68	14.14	13.27
40.532	 Phylloquinone	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	2.35	3.33	4.54	4.00

Table 5. Chemical constituents identified in metabolic extracts from *Pseudomonas* spp.

Table 1, Supplementary

Location of collection of marine sediment at Lucena Beach, state of Paraíba, Brazil.

Collection		
point	Date	Latitude, Longitude
1	Dec/2016	6.896313S, 34.869187W
2	Dec/2016	6.893422S, 34.874026W
3	Dec/2016	6.89524S, 34.871993W
4	Jan/2017	6.893003S, 34.87183W
5	Jan/2017	6.889096S, 34.880201W
6	Jan/2017	6.891482S, 34.877787W
7	Fev/2017	6.893369S, 34.874823W
8	Fev/2017	6.890146S, 34.873841W
9	Fev/2017	6.890331S, 34.87693W
10	Apr/2017	6.896163S, 34.870148W
11	Apr/2017	6.892522S, 34.874221W
12	Apr/2017	6.89515S, 34.870564W
13	May/2017	6.894161S, 34.873265W
14	May/2017	6.891068S, 34.87894W
15	May/2017	6.894064S, 34.871645W
16	Jun/2017	6.89198S, 34.877598W
17	Jun/2017	6.891089S, 34.876372W
18	Jun/2017	6.894376S, 34.870171W
19	Sep/2017	6.899566S, 34.861317W
20	Sep/2017	6.869525S, 34.86147W
21	Sep/2017	6.899405S, 34.862048W

Table 2, Supplementary

Precipitation at North coast of State of Paraíba, Brazil, recorded during the study.

Month/ Year	Average (mm)
Dec - 2016	96
Jan - 2017	78.8
Fev - 2017	70.7
Apr - 2017	183.5
May - 2017	172.5
Jun - 2017	168.8



**Screening of Actinobacteria from marine sediment for
identification of novel antimicrobials in Northeast
Brazilian
coast**

Journal:	<i>Journal of Basic Microbiology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Vaz, Renata; Federal Rural University of Pernambuco Almeida, Sintia; Universidade Federal do Ceará Craveiro, Cecilia; Federal Rural University of Pernambuco Peixoto, Silvio; Federal Rural University of Pernambuco Melo, Vania; Universidade Federal do Ceará Lima-Filho, Jose; Federal Rural University of Pernambuco, Biology
Keywords:	microbiome, shotgun, actinomycetes, antibiotic, multi-resistance

**Screening of Actinobacteria from marine sediment for identification of novel antimicrobials
in Northeast Brazilian coast**

Renata Valença Vaz ^a, Sintia Almeida ^b, Cecília Craveiro ^c, Sílvio Ricardo Maurano

Peixoto ^c, Vânia Maria Maciel Melo ^{d*}, José Vitor Moreira Lima-Filho ^{a**}

^a Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Genomics and Bioinformatics Center (CeGenBio), Federal University of Ceará, Fortaleza, PE,
Brazil

^c Department of Fisheries and Aquaculture, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE,
Brazil

^d Department of Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, PE, Brazil

Corresponding authors:

**1. * Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia,
Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Campus do Pici, Bloco 909
B. Pici, CEP 60455-760 - Fortaleza, CE – Brasil. E-mail: vmmelo@gmail.com**

**2. ** Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de
Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dom Manoel de
Medeiros, s/n, B. Dois Irmãos, Recife-PE, CEP 52171-900 – Recife, PE-
Brasil. E-mail: jose.mlimafo@ufrpe.br; jvitormlf@yahoo.com.br**

Abstract

The impact on public health of emerging diseases and antimicrobial resistance requires multidisciplinary actions for discovery of novel medicines. The aim of this study was screening Actinobacteria from marine sediment for identification of metabolic pathways for novel antimicrobials. Samples of marine sediment were collected at 10 m depth with a Van Veen dredge offshore from Lucena Beach in Northeast Brazil. The metagenomic DNA were pooled for construction of genomic libraries. Shotgun sequencing was carried out through the MiSeq System. Alpha and beta diversity were determined using the q2-diversity plugin in QIIME2 at a sampling depth of 6,060. Paired-end DNA sequencing reads were assembled into metagenomes and compared with different database. Proteobacteria was the most abundant phylum, with 75.6% of the reads, followed by Firmicutes (13.24%) and Bacteroidetes (7.52%). The abundance of the phylum Actinobacteria reached 2.6% of the total reads. *In silico* analyses revealed genes involved in two metabolism pathways in the genus *Streptomyces*: 1) terpenoids, polyketides and carotenoids; and 2) other secondary metabolites, including stilbene. In addition, we found 179 antibiotic-resistant genes associated to 17 antibiotic classes from other bacteria in marine sediment. We conclude that cultivation of marine Actinobacteria from the genus *Streptomyces* can lead to production of novel broad-spectrum antimicrobials. However, attention should be paid to marine bacteria that carry antibiotic resistance genes to hospital-restricted drugs.

Keywords: microbiome, shotgun, actinomycetes, antibiotic, multi-resistance.

1. Introduction

Since Alexander Fleming's discovery of penicillin in 1929, attempts have been made to cultivate microorganisms that biosynthesize secondary metabolites with antibiotic action. In the 1970s, the main classes of antibiotics currently in use today have already been discovered [1]. However, its indiscriminate use over the years has favored the natural selection of antibiotic-resistant pathotypes that can cause ten million deaths each year worldwide by 2050 [2]. Drug-resistant microorganisms continue to multiply in the presence of antibiotics administered at therapeutic levels and may harbor different antibiotic resistance genes (ARGs) [3]. Although it is in the hospital environment that resistant microorganisms are normally identified, the natural environment (soil, rivers and seas) and wild animals can represent an underestimated reservoir of strains with ARGs.

Among the five strategic objectives of the “global action plan on antimicrobial resistance” of the World Health Organization is to increase investments in new medicines [4]. In this sense, problems related to viral infectious outbreaks, cancer and antimicrobial resistance require multidisciplinary actions to investigate biological resources still little explored, such as the marine environment. For example, between 2014 and 2018, marine bacteria from the phyla Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, along with fungi and dinoflagellates, were responsible for the greatest discovery of new antimicrobials, such as peptides, siderophores, polyketides and terpenes [5]. In particular, Actinobacteria are gram-positive chemoheterotrophic bacteria broadly known to produce β -lactam antibiotics, tetracyclines, rifamycins, aminoglycosides, macrolides and glycopeptides [6].

In the marine environment, Actinobacteria are widely distributed on the sea surface, water column, sediment and in symbiosis with vertebrates and invertebrates [7]. They have ecological importance by improving physical and environmental parameters

through the decomposition and recycling of compounds, the mineralization of organic matter, and nitrogen correction. In particular, the genus *Streptomyces* is among the most efficient producers of secondary bioactive metabolites in response to competition for nutrients in the environment [8]. Although marine microorganisms have been used as models in studies of the biosynthetic mechanisms of bioactive compounds, there are challenges related to the reproducibility of their conventional laboratory cultivation, directly affecting expression of genes related to various biosynthetic pathways [9]. Genetic sequencing and the development of algorithms for *in silico* analysis enable a study approach guided by the screening of taxonomic groups with prospective gene clusters among marine microbial communities.

According to Hoshino et al. [10], the diversity and taxonomic abundance vary according to the depth of the sediments, sulfate concentration, organic matter and the presence or absence of dissolved oxygen. In view of the advances in metagenomic technologies, massive sequencing and mining of biosynthetic genes, in this study we investigated Actinobacteria in marine sediment as potential sources of gene clusters for novel antimicrobials.

2. Materials and methods

2.1 Collection of marine sediment

Expeditions were carried out to Lucena Beach (state of Paraíba, Brazil) between December 2016 and September 2017 (Sisgen: A54D967). Twenty-one samples were collected at different offshore points at a depth of 10 meters using Van Veen dredge (Figure 1, Table 1). Samples were stored in sterile refrigerated containers and sent to the

Laboratory of Microbiology and Immunology (Lamim) at Federal Rural University of Pernambuco for processing.

2.2 Extraction of metagenomic DNA

The collected sediment was centrifuged to remove the marine water. Then, samples were weighed (0.25 g) and used for total DNA extraction with use of a commercial kit following the manufacturer's instructions (Power Soil™ DNA Isolation kit; MoBio, Carlsbad, CA, USA). The concentration and purity of metagenomic DNA were determined with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Minnesota, USA). The integrity of the DNA was confirmed by electrophoresis in 1% agarose gel, developed with SybrSafe DNA solution (Invitrogen, USA). The data were recorded in a photo-documentation system with ultraviolet light. The genomic DNA was stored in a freezer at -20 °C until use to build the metagenomic library.

2.3 Construction of the metagenomic library

Equimolar amounts of metagenomic DNA from different samples were pooled for construction of genomic libraries. A custom protocol Nextera XT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) was used. The metagenomic library was sequenced at the Nucleus for Research and Development of Medicines (NPDM) at Federal University of Ceará (UFC), through the new generation platform of the MiSeq System (Illumina, San Diego, CA). The MiSeq Reagent Kit V2 (500 cycles) was used, according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA).

2.4 Analysis of the sequences

The metagenomic sequences were submitted to quality checks using FastQC v0.10.1 and BBDuk (version 37.95; <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/bb-user-guide-tools/bbduk-guide/>). BBDuk was used to remove contaminants and sequence reads that contained the adapter column or where quality dropped to zero. In addition, sequence reads with four or more bases or those with an average quality score of less than 25 and length ≤ 100 bp were removed. ASVs were inferred using QIIME2 (2019.10 version). Alpha diversity (Shannon's diversity, observed ASVs, and Pielou's evenness) and beta diversity (Bray-Curtis distance) were determined using the q2-diversity plugin in QIIME2 at a sampling depth of 6,060.

2.5 Metagenome assembly and functional characterization

After low quality nucleotides were removed, paired-end DNA sequencing reads for each sample were assembled into metagenomes using standard parameters and various k-mer values with MEGAHIT (v 1.1.2). To explore the metabolic potential of the shotgun sample, the data were compared with the SEED subsystems on the MG-RAST server using a maximum "e" value of $1e-5$, minimum identity of 60% and minimum alignments of 15 aa for protein and 15 bp for DNA.

2.6 Detection of the metagenome antibiotic resistance (ARG) gene

A BLAST nucleotide database was created using homologous ARG FASTA protein sequences found in the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v1.1.8 and MEGARES database with a cutoff value of 1.0^{-10} to ensure high alignment confidence. When a sequence segment was aligned to several ARGs, the occurrence with the lowest value, along with the longest alignment length, was considered the true match.

3. Results

The shotgun dataset contained 1,955,215 sequences and 338,795,202 base pairs, with an average length of 173 bps (Figure 2). Of the tested sequences, 125,316 (6.41%) did not pass through the QC pipeline, and dereplication identified 95,496 of these sequences as artificial duplicate reads. Among those sequences that passed QC, 12,249 sequences (1%) contained ribosomal RNA genes, 1,131,597 sequences (64.50%) predicted proteins with known functions, and 610,602 sequences (34.80%) predicted proteins with unknown functions. The rarefaction curves were produced using the M5NR database [11]. It represents species data from taxonomic categories of the shotgun metagenome. The cutoff points used were: alignment length, 15 bp; e value, e^{-5} ; and percentage identity, 60%.

After using MG-RAST, we found that Proteobacteria was the most abundant phylum, with 75.6% of the reads, followed by Firmicutes (13.24%) and Bacteroidetes (7.52%) from 1,955,215 sequences (Table 2). Kraken analyses showed 1,370,769 sequence reads and similar taxonomic abundance (Figure 3). For example, MG-RAST identified 238 orders and Kraken 209 orders. However, regarding the phylum Actinobacteria, there was critical difference in the taxonomic classification between the two algorithms, since MG-RAST assigned 5939 reads and Kraken 18568 reads (Table 2).

The distribution of functional categories for KEGG [12], COG [13] and eggNOGs [14] at the highest level supported by these functional hierarchies is shown in Figure 4. The data show that most of the functions were related to metabolism. Contigs were used to predict 83,843 proteins, of which only 71,688 (85.5%) had significant blastp correspondence (E^{-5} value) against the NR RefSeq protein database. A total of 26,298 (31.4%) proteins were classified using Gene Ontology (GOs) by Blast2GO and Interpro.

In the phylum Actinobacteria, 5481 proteins had functions related to its functional categories (Figure 5).

The results also revealed the presence of 26 genes involved in two metabolism pathways in the genus *Streptomyces* (Figure 6): 1) terpenoids, polyketides and carotenoids; and 2) other secondary metabolites, including stilbene. The search for antibiotic-resistance genes revealed 7,902 readings in MEGARES database, and 8,562 sequences in CARD, with an average length of 100 bp and average identity percentage of 91%. The classes of antibiotics whose microorganisms in the samples have resistance genes are shown in figure 7.

4. Discussion

Along its 15 km of beach, Lucena beach receives great influence from the Paraíba River. This river is 380 km long and runs through dozens of municipalities in the state of Paraíba, Northeast Brazil. In this study, Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes were the most abundant phyla in the marine sediment. These microbial groups have previously been associated with human intestinal microbiota in terrestrial biomes [15]. Therefore, although samples were collected at 10 m depth, the influence of anthropogenic pollution cannot be discarded. The abundance of the phylum Actinobacteria reached 2.6 % of the total reads. In this taxonomic group, the majority of functional genes were related to metabolism, with two biosynthetic pathways.

The pathway for production of terpenoids, polyketides and carotenoids is associated with biosynthesis of halogenic compounds with antimicrobial properties in *Streptomyces* strains [16]. For instance, terpenoid phenazines obtained from fermentation with marine strains of *Streptomyces* ssp. were reported to have anti-inflammatory,

antitumor and antifungal actions [17]. In addition, the antibiotic erythromycin, the antifungal amphotericin B and the antiparasitic ivermectin are examples of well-known polyketides [18]. Such metabolic pathway may also be responsible for the synthesis of meroterpenes and polyketide-terpenoid hybrid natural products.

Terpenes and their derivatives have long been described as having potent antimicrobial activity [19]. Accordingly, there were nine correspondences with the degradation pathway of geraniol, which is a flavorful terpene with antifungal and antibacterial properties extensively found in plants [20]. Likewise, gene sequences found for biosynthesis of carotenoids reinforce prospective antibacterial properties [21]. Indeed, cryptic sequences not expressed under conventional culture conditions have been used for production of carotenoids in *Streptomyces* [22], which increases the likelihood of discovering novel bioactive compounds.

The second metabolic pathway identified in Actinobacteria was associated with secondary metabolites such as phenylpropanoids, which have been exploited for drug discovery due to their low toxicity and broad pharmacological activity [23]. *Streptomyces* ssp. produce the enzymes phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase, involved in metabolic pathways of antimicrobials derived from benzoic acid and type III polyketide synthase (PKS-III) [24]. These are the main biosynthetic catalysts in phenylpropanoid and flavonoid assembly, supporting the significance of the present study. The same metabolic pathway has shown four genes corresponding to biosynthesis of streptomycin, the first antibiotic used to successfully fight tuberculosis, discovered in 1943 [25].

Furthermore, there were six genes corresponding to the pathway for biosynthesis of stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol. This is also a more frequent biosynthetic pathway in plants, catalyzed by PKSIII enzymes and responsible for the synthesis of bioactive aromatic polyphenols of the stilbene class [26]. For example, resveratrol, a

polyketide produced by stilbene synthase, has anti-inflammatory, anticancer, antimicrobial and antidiabetic properties [27]. However, there are only a few reports of the synthesis of resveratrol by streptomycetes.

Along with metabolic pathways related to production of antimicrobials, we identified resistance genes to fluoroquinolones, aminoglycosides, glycopeptides, tetracyclines, beta-lactams, macrolides, multiple drug efflux pumps, and others. The 179 ARGs were associated to 17 antibiotic classes, being the most abundant genes for resistance to macrolides, aminoglycosides and rifamycins. According to Amarasiri et al. [28], antibiotic-resistant strains arise in marine environment due to different reasons: 1) coastal runoff and frequent mixing of bacteria from terrestrial and marine sources during cycles between tides; 2) anthropogenic action, through the deposit of waste in rivers or directly in the ocean. In addition, the natural process of producing antibiotics by microorganisms can also favor the development of natural defense mechanisms.

In 2018, of the 240 new natural products of marine origin, 167 new metabolites were attributed to the genus *Streptomyces* [29]. Thus, it was not surprising that in our findings the biosynthetic pathways of Actinomycetes had greater correspondence with the genus *Streptomyces*. However, the impact that the urban spread of drug-resistant “wild” strains may have on public health is poorly understood. Previously, we have shown that information about drug-resistant bacteria in the oral cavity of sharks could be used to guide the antibiotic-therapeutic treatments of patients suffering from shark attack in Recife, Brazil [30].

Taken together, we have shown that although the remarkable ability to produce bioactive compounds of *Streptomyces* has been well established in the last four decades, this group remains an important source of new molecules, especially in the marine

environment. On the other hand, attention should be paid to marine bacteria that carry antibiotic resistance genes to hospital-restricted drugs.

Acknowledgments

We thank the Genomics and Bioinformatics Center (CeGenBio) from Federal University of Ceará by sequencing of metagenomics DNA.

Author Contribution Statement

RV conducted experiments. SA performed bioinformatics analyses. CC and SRMP collected marine sediments. RV, VMMM and JVLF designed experiments and wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study was funded by FACEPE – Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (Grant number: IBPG-0561-2.12/15), Brazil, which provided a Scholarship to PhD student R.V. Vaz. CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, which provided funding for consumables through PROAP/Renorbio.

5. References

- [1] Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303(6-7): 293-297
- [2] O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. London: HM Government and the Wellcome Trust. 2016; In: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
- [3] Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006; 42 Suppl 2:S82-9
- [4] WHO - World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. In: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736> Accessed November 2020.
- [5] Santos JD, Vitorino I, Reyes F, Vicente F, Lage OM. From Ocean to Medicine: Pharmaceutical Applications of Metabolites from Marine Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(8):455
- [6] Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep.* 2017; 34(10):1203-1232
- [7] Ward AC, Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(3):279-86
- [8] Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015; 80(1):1-43.
- [9] Yang Z, He J, Wei X, Ju J, Ma J. Exploration and genome mining of natural products from marine Streptomyces. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104(1):67-76.
- [10] Hoshino T, Do H, Uramoto GI, Wörmer L, Adhikari, RR, Xiao N, et al. Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117(44):27587-27597
- [11] Wilke A, Harrison T, Wilkening J, Field D, Glass EM, Kyrpides N, et al. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics* 2020; 13:141

- [12] Kanehisa M. The KEGG database. In [‘In Silico’ Simulation of Biological Processes. Novartis Foundation Symposium. 2002; 247: 91–103](#)
- [13] Tatusoy R, Koonin E, Lipman D. A genomic perspective on protein families. *Science* 1997; 278(5338):631-7
- [14] Jensen LJ, Julien P, Kuhn M, von Mering C, Muller J, Doerks T, et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: D250-4
- [15] Chen J, McIlroy SE, Archana A, Baker DM, Panagiotou G. A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. *Microbiome* 2019; 7(1):104
- [16] Řezanka T, Spížek J. Halogen-containing antibiotics from streptomycetes. *Stud Nat Prod Chem.* 2003; 29:309-353
- [17] Kasanah N, Triyanto T. Bioactivities of halometabolites from marine actinobacteria. *Biomolecules* 2019; 9(6):225
- [18] Kornfuehrer T, Eustaquio A (2019) Diversification of polyketide structures via synthase engineering. *Medchemcomm* 10(8):1256-1272
- [19] Mahizan NA, Yang SK, Moo CL, Song AAL, Chong CM, Chong CW, et al. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules* 2019; 24(14):2631
- [20] Lira MHP, de Andrade Júnior FP, de Moraes GFQ, Macena GS, Pereira FO, Lima IO. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *J Essent Oil Res.* 2020; 32:3, 187-197
- [21] Karpiński TM, Adameczak A. Fucoxanthin-an antibacterial carotenoid. [Antioxidants \(Basel\) 2019; 8\(8\): 239](#)
- [22] Becerril A, Álvarez S, Braña AF, Rico S, Díaz M, Santamaría RI, et al. Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. [PLoS One](#) 2018; 13(5): e0198145
- [23] Wang JF, Liu SS, Song ZQ, Xu TC, Liu CS, Hou YG, et al. Naturally occurring flavonoids and isoflavonoids and their microbial transformation: a review. [Molecules](#) 2020; 25(21): 5112
- [24] Moore BS, Hertweck C, Hopke JN, Izumikawa M, Kalaitzis JA, Nilsen G, et al. Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone1. *J Nat Prod.* 2002; 65(12):1956-62
- [25] Wainwright M. Streptomycin: discovery and resultant controversy. *Hist Philos Life Sci.* 1991; 13(1):97-124.
- [26] Mattio LM, Catinella G, Dallavalle S, Pinto A. Stilbenoids: A natural arsenal against bacterial pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(6):336
- [27] De Luca D, Lauritano C. In silico identification of Type III PKS chalcone and stilbene synthase homologs in marine photosynthetic organisms. *Biology (Basel)* 2020; 9(5):110
- [28] Amarasiri M, Sano D, Suzuki S. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Crit Rev Env Sci Tec.* 2020; 50:19, 2016-2059
- [29] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2019; 36: 122-173
- [30] Interaminense JA, Nascimento DCO, Ventura RF, Batista JEC, Souza MMC, Hazin FHV, Lima-Filho JV. Recovery and screening for antibiotic susceptibility of potential bacterial pathogens from the oral cavity of shark species involved in attacks on humans in Recife, Brazil. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 8):941-947

