

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO
GRANDE E SEDIMENTOS DO LESTE DO ATLÂNTICO SUL

Marcus Adonai Castro da Silva

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
JUNHO, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO
GRANDE E SEDIMENTOS DO LESTE DO ATLÂNTICO SUL

Marcus Adonai Castro da Silva
Oceanógrafo (UNIVALI)
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental (UNIVALI)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de Microbiologia do Ambiente

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
JUNHO, 2013

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Gertrudes Corção e André Oliveira de Souza Lima pela orientação, ensinamentos e apoio em vários aspectos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. José Angel Alvarez Perez, coordenador do projeto “Patterns and Processes of the Ecosystems of the Southern Mid-Atlantic” – Census of Marine Life (CoML), pelo suporte no embarques e coleta de amostras.

Ao Dr. André Silva Barreto e aos biólogos Estácio Jussie Odisi e Felipe Araújo Teixeira Paulo pela coleta de amostras.

Aos pesquisadores Angélica Cavalett, Ananda Spinner, Daniela Cristina Rosa, Regina Beltrame Jasper, Maria Carolina Quecine, Maria Letícia Bonatelli, Aline Pizzirani-Kleiner, Aline Diniz, Rodrigo Penque, Maria Letícia Biavatti, Jurandir Pereira Filho, e Leonardo Rübi Rorig pelas suas respectivas contribuições ao trabalho.

Aos biólogos Tiago Tolentino, Thiago Mello e ao oceanógrafo César Stramosck pelo apoio nas atividades laboratoriais.

Ao International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) e o Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 577915/2008-8) pelo suporte financeiro.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a pós-graduação e Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente pelo suporte durante a realização do curso.

A Universidade do Vale do Itajaí pelo suporte para a realização as atividades laboratoriais deste trabalho.

A minha família Maria Mansur, Frodo e Quendi pelo apoio emocional durante toda a realização do trabalho e do curso, sem qual não teria chegado até aqui.

A meus pais André e Regina, e irmãos, André e Marcelo, pelo apoio emocional e financeiro em muitas situações.

IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO GRANDE E SEDIMENTOS DO LESTE DO ATLÂNTICO SUL

Autor: Marcus Adonai Castro da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gertrudes Corção

Co-orientador: Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

RESUMO

O Atlântico Sul está entre os menos estudados dos oceanos, em relação às suas comunidades microbianas, apesar da importância ecológica e do interesse biotecnológico nos micro-organismos marinhos. Este potencial biotecnológico inclui a produção de enzimas como as lipases e endoglicanases, que podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis, no processamento têxtil e na suplementação de detergentes. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o isolamento, identificação filogenética e avaliação das atividades lipolíticas e endoglicanolíticas de bactérias cultivadas de sedimentos do leste do Oceano Atlântico Sul, e de águas da região da Elevação do Rio Grande. Para isto, oito amostras de sedimento e dezesseis de água foram coletadas em novembro de 2009 e novembro de 2011, para as referidas regiões do Oceano Atlântico Sul. Os micro-organismos foram cultivados e identificados pela análise de sequências de genes de RNA ribossômico 16S. Posteriormente, as atividades lipolíticas e endoglicanolíticas foram determinadas em ensaios em placas com diferentes substratos tais como Tween20, Tween40, Tween60, Tween80 para a atividade lipolítica, e carboximetilcelulose para a atividade endoglicanolítica. No total 212 linhagens foram isoladas e 138 foram identificadas filogeneticamente das duas áreas de estudo, em cinco classes diferentes e trinta gêneros, sendo as classes Gammaproteobacteria e Bacilli as mais frequentes, assim como os gêneros *Halomonas* e *Bacillus*. Os sedimentos apresentaram maior diversidade em nível de espécie, enquanto que nas amostras pelágicas a diversidade foi maior em nível de gênero e classe. Dezoito linhagens isoladas parecem pertencer a espécies ainda não descritas de bactérias. As 212 linhagens foram testadas quanto às atividades enzimáticas. Mais que metade destes organismos apresentou algum tipo de atividade lipolítica, enquanto que a atividade endoglicanolítica foi restrita a dez linhagens. O método de isolamento direto em meio sólido contendo lipídeos foi o mais apropriado para a prospecção de bactérias lipolíticas. Os resultados deste trabalho atestam a necessidade de estudos sobre a microbiota marinha cultivável, bem como seu potencial para a obtenção de enzimas com uso industrial.

IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO GRANDE E SEDIMENTOS DO LESTE DO ATLÂNTICO SUL

Author: Marcus Adonai Castro da Silva

Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

Co-advisor: Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

ABSTRACT

The South Atlantic is among the less studied oceans concerning its microbial communities, despite the ecological importance and the biotechnological interest related to marine microorganisms. In this context, the present work aimed the isolation, phylogenetic identification and evaluation of the lipolytic and endoglucanolytic activities of bacteria from sediments of the Eastern South Atlantic and waters from the Rio Grande Rise Region. For this, eight sediment samples and sixteen water samples were collected in two cruises conducted on November/2009 and November/2011 to the specified areas. Microorganisms were cultivated and identified by 16S rRNA sequences analysis. Lipolytic and endoglucanolytic activities were evaluated on plate assays with different substrates (Tween20, Tween40, Tween60, Tween80 for lipolytic activity, and carboxymethylcellulose for endoglucanolytic activity). 138 bacteria were phylogenetically identified from the two studied areas in five different classes and thirty genera. The classe Gammaproteobacteria and Bacilli and the genera *Halomonas* and *Bacillus* were the most frequent identified. Higher species-level diversity was detected in sediments, but a higher genus- and class-level diversity was present on waters samples. Eighteen strains seem to belong to no yet described bacterial species. Two hundred and twelve strains were tested for the enzymatic activities. More than a half of the bacteria showed some kind of lipolysis, while the endoglucanolytic activity was restricted to ten strains. The direct isolation in solid media containing a lipidic substrate was the best method to prospect lipolytic bacteria. The results of this work attest the necessity of studies on the cultivable marine microbiota, as well as their potential for the prospection of industrially relevant enzymes.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Oceanografia do Atlântico Sul	4
2.2 Métodos de Estudo da Diversidade Microbiana.....	7
2.3 Bactérias Marinhas Cultiváveis	9
2.4 Bioprospecção de Enzimas em Micro-organismos Marinhos	16
2.5 Diversidade Microbiana na Região da Elevação do Rio Grande e no Leste do Oceano Atlântico Sul.....	21
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	24
3.1 Artigo 1: Phylogenetic Identification of Marine Bacteria Isolated from Deep-Sea Sediments of the Eastern South Atlantic Ocean	24
3.2. Artigo 2: Phylogenetic Identification and Distribution of Cultivable Pelagic Bacteria from the Rio Grande Rise region, South Atlantic Ocean.....	54
3.3. Artigo 3: Atividade Lipolítica e Endoglucanólítica de Bactérias Isoladas de Águas da Região da Elevação do Rio Grande e de Sedimentos do Leste do Oceano Atlântico Sul	92
4. DISCUSSÃO GERAL	125
5. CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Espécies e gêneros de bactérias marinhas nas quais a atividade celulolítica já foi relatada, e os grupos filogenéticos aos quais elas pertencem.	20
Table 1. Colony counts (MA plates) and number of strains obtained from the three culture media employed.	50
Table 2. Numbers of each OTU identified in more than one sample analyzed.	50
Table 3. Localization and depths of sediment samples studied.....	50
Additional file 1. Identification, similarity percentage and strains in each operational taxonomic unit identified in the present study.	51
Table 1. Localization and depths of each sample studied. All samples were processed in 11/24/2011.	81
Table 2. Description, similarity percentage and number of strains for each operational taxonomic unit (OTU) identified in the present study.	82
Tabela 1. Número total de linhagens (N) e número de linhagens que apresentaram atividade hidrolítica sobre cada um dos quatro lipídeos testados, para cada gênero bacteriano estudado.....	119
Tabela 2. Número total de linhagens (N) e linhagens que apresentaram atividade hidrolítica sobre cada um dos quatro lipídeos testados, para cada espécie dos gêneros <i>Bacillus</i> e <i>Halomonas</i>	120
Tabela 3. Linhagens que se destacaram em relação aos seus índices enzimáticos sobre lipídeos, estação e profundidade de origem, e seus respectivos índices médios de atividade enzimática e desvios padrão. As linhagens identificadas foram obtidas por isolamento direto em meio sólido, enquanto que as duas não identificadas foram obtidas por enriquecimento com CMC. Todas as linhagens foram isoladas a partir de amostras de água.	120
Tabela 4. Linhagens que apresentaram atividade celulolítica, amostra, estação e profundidade de origem, e seus respectivos índices médios de atividade enzimática e desvios padrão.....	121
Tabela 2. Síntese dos resultados de diversidade de bactérias cultivadas. UTOs, Unidades Taxonômicas Operacionais.....	126

Tabela 3. Linhagens identificadas que provavelmente pertencem a novas espécies, linhagem tipo mais similar, e porcentagem de similaridade, para cada tipo de amostra analisado e classe bacteriana identificada.	130
Tabela 4. Micro-organismos que se destacaram em relação a sua alta atividade hidrolítica ou pela atividade em baixas temperaturas, estação e profundidade de origem.	133
Tabela 5. Espécies de bactérias identificadas neste trabalho, que apresentaram hidrólise para todos os lipídeos testados, número de linhagens com atividade e classe taxonômica.	134

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Padrão de circulação de água profunda do Oceano Atlântico Sul. AABW, Água de Fundo do Antártico; NADW, Água Profunda do Atlântico Norte.	6
Figura 2. Dendrograma mostrando a relação evolutiva entre os principais grupos filogenéticos (nomes em cores) de bactérias marinhas cultiváveis. A barra representa a distância evolutiva. Os valores de bootstrap (ramificações) se referem a 1000 replicações. A árvore foi construída a partir de sequências parciais e totais de genes 16S de representantes de cada família exibida, depositadas no GenBank e alinhadas utilizando o algoritmo Muscle, Software Mega5.	10
Figure 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Gammaproteobacteria strains.	47
Figure 2. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Firmicutes/Actinobacteria strains.	48
Figure 3. Dendrogram showing the similarity of the samples, accordingly to the presence/absence of the established OTUs.	49
Figure 4. Localization of the sampling stations.	49
Figure 1. The Rio Grande rise, with the four sampling stations marked (source: Google Earth).	83
Figure 2. Vertical profiles of colony forming units per millilitre (CFU/ml) for all stations.	83
Figure 3. Vertical profiles of Chlorophyll-a ($\mu\text{g/l}$) for stations 6, 11 and 14.	84
Figure 4. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 4.	85
Figure 5. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 6.	86
Figure 6. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 11.	87
Figure 7. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 14.	88
Figure 8. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Gram-negative strains.	89

Figure 9. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Gram-positive strains.....	90
Figure 5. Vertical distribution of the bacterial classes identified at the four sampling stations.....	91
Figure 6. Ordination produced from PCA of the chemical variables and the bacterial classes. The cumulative percentage of variance explained by each factor extracted is showed.....	91
Figura 1. A Elevação do Rio Grande, com as quatro estações de coleta assinaladas.	121
Figura 2. Porcentagem dos micro-organismos que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato lipídico, em cada tipo de enriquecimento realizado e entre as linhagens obtidas por isolamento direto em meio sólido. CMC, carboximetilcelulose.....	122
Figura 3. Porcentagem dos micro-organismos de sedimentos obtidos a partir dos três meios sólidos empregados que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato lipídico testado. AM, linhagens isoladas em Ágar Marinho; AM+CMC, linhagens isoladas em Ágar Marinho suplementado com CMC a 0,5%; AM+T40, linhagens isoladas em Ágar Marinho suplementado com Tween40 a 0,5%.	122
Figura 4. Porcentagem dos micro-organismos testados que apresentaram atividade hidrolítica, para cada substrato lipídico, para cada estação e profundidade amostrada. Na profundidade de 200m, estação 6, apenas um micro-organismo foi obtido, portanto não foi plotado no gráfico.	123
Figura 5. Distribuição da atividade hidrolítica das classes bacterianas identificadas sobre cada substrato lipídico.....	123
Figura 6. Número de linhagens que apresentaram atividade lipolítica para cada temperatura avaliada. A avaliação foi conduzida em placas de Ágar Marinho suplementado com Tween20 a 0,5%.	124
Figura 3. Distribuição das linhagens de sedimentos e água entre as classes de bactérias identificadas.....	126
Figura 4. Número de linhagens para cada gênero de bactéria identificado nas amostras de sedimentos (esquerda) e água (direita).	129

Figura 5. Porcentagem dos micro-organismos testados (n = 212) que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato avaliado, em ensaios em placas de Petri, conduzidos a 30⁰C..... 132

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µl, microlitro

µm, micrômetros

µM, micromolar

ABW, Antarctic Bottom Water ou Água de Fundo Antártica

ATP, Adenosina trifosfato

CFU/ml ou g, Colony-forming units ou unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro

Cm, Centímetros

CMC, Carboximetilcelulose

CNPq, Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CoML, Census of Marine Life

CTD, sistema de medição da condutividade, temperatura e profundidade

Da, Dáltons

EFB, Endospore-forming bacteria ou bactérias formadoras de endósporos

g, grama

G+C, Guanina mais citosina

GF/F Filtros de fibra de vidro

ICGEB, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology

IE, Índice enzimático

Km, quilômetro

M, metro

MA, Ágar Marinho

MA+CMC, Ágar Marinho suplementado com Carboximetilcelulose

MA+Tween40, Ágar Marinho suplementado com Polisorbato de Monopalmitato

MBC, Enriquecimento com CMC

MBT, Enriquecimento com Tween20

mM, milimolar

MVSP, Multivariate Statistical Package

NADW, North Atlantic Deep Water ou Água Profunda do Atlântico Norte

NCBI, National Center for Biotechnology Information

ng, nanograma

°C, graus Celsius

°S, latitude sul

OTU, Operational taxonomic unity ou unidade taxonômica operacional

°W, longitude oeste

PCA, Análise de componentes principais

PCR, Polymerase chain reaction ou reação de polimerização em cadeia

R/V, Research vessel ou embarcação de pesquisa

RNA, Ácido ribonucléico

rRNA, Ácido ribonucléico ribossômico

SW, Southwest ou sudoeste

Tween20, Polisorbato de Monolaurato

Tween40, Polisorbato de Monopalmitato

Tween60, Polisorbato de Monoestearato

Tween80, Polisorbato de Mono-oleato

UPGMA, Unweighted pair-wise grouping with mathematical averages

UV, Ultravioleta

β, beta

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas marinhos representam um dos maiores desafios para a compreensão da biodiversidade microbiana. Isto está relacionado com a amplitude dos oceanos no planeta Terra e com a diversidade de ambientes reconhecidos como marinhos. Entre estes ambientes, os classificados como mares profundos são os mais amplamente distribuídos pelo globo e ao mesmo tempo os menos estudados, em função das dificuldades intrínsecas de obtenção de amostras e processamento em laboratório. Logo, pouco é conhecido sobre os micro-organismos presentes nestes ecossistemas, apesar da sua significância do ponto de vista ecológico marinho.

A partir das últimas três décadas estabeleceu-se que a maioria dos micro-organismos marinhos não cresce nos meios de culturas normalmente empregados em laboratório (FUHRMAN; HAGSTRÖM, 2008). Isto levou ao desenvolvimento de diversas metodologias que, independentes do cultivo, permitiram uma melhor descrição das comunidades de procariotos presentes em amostras marinhas. Entretanto, estas metodologias, enquanto que permitiram o estabelecimento da presença e quantificação dos micro-organismos nas amostras, foram limitadas na descrição das funções ecológicas dos organismos detectados. Ultimamente tem-se empregado a análise de metagenomas e metatranscriptomas neste sentido (LÜCKERA et al., 2010), porém o estudo de culturas microbianas ainda é a forma mais direta de estudar a fisiologia de um determinado micro-organismo e compreender sua função nos ecossistemas (GIOVANNONI; STINGL, 2007).

O estudo de culturas microbianas não é limitado ao conhecimento fisiológico e sua contribuição ecológica. Grande parte dos estudos realizados

sobre diversidade é estimulada pelo potencial biotecnológico dos micro-organismos e à descrição de novas espécies. São vários os produtos obtidos de micro-organismos, incluindo enzimas (LEE et al., 2010) e produtos ativos como antibióticos e antitumorais (PETTIT, 2011). Além disso, vários processos baseiam-se na atividade microbiana, incluindo a biorremediação (DASH et al., 2013) e processos de tratamento de esgoto (MENDES; CASTRO, 2005). Tratando-se de micro-organismos marinhos de águas profundas, o potencial para biotecnologia já foi demonstrado em vários trabalhos, como a produção de moléculas de tipo exopolissacarídeos (QIN et al., 2007), metabólitos secundários como antitumorais (PETTIT, 2011), pigmentos (KOBAYASHI et al., 2007) e enzimas (DANG et al., 2009). Considerando que estes organismos representam apenas uma pequena porcentagem das bactérias presentes nos ambientes de mares profundos, o potencial existente na microbiota destes locais é enorme e seu estudo possibilita não só o aprimoramento dos produtos e processos até então conhecidos, como permite a descoberta de novas moléculas com propriedades únicas, e a descrição de novas espécies (GOODFELLOW et al., 2012; YOU et al., 2013). Logo, este estudo permitirá a obtenção de novos organismos com potencial biotecnológico, além de gerar informações sobre a diversidade microbiana, que poderão servir de base para o entendimento da fisiologia e função ecológica dos micro-organismos de ambientes profundos, e descrição de novas espécies bacterianas.

Neste contexto o presente trabalho objetivou o estudo da diversidade e, visando o potencial para a produção de biocombustíveis, a atividade lipolítica e endoglucanólítica de bactérias cultivadas de amostras de sedimento, coletadas na parte leste do Atlântico Sul, e de água, oriundas da

região da Elevação do Rio Grande. Especificamente o presente trabalho teve os seguintes objetivos: (1) identificar bactérias cultivadas das áreas de estudo pela análise de genes 16S; (2) verificar variações espaciais nas comunidades de bactérias cultiváveis nas áreas de estudo; (3) identificar associações entre as bactérias cultiváveis e variáveis ambientais na região da Elevação do Rio Grande; (4) avaliar a atividade lipolítica e endoglucanólítica dos microorganismos isolados (5); comparar as atividades hidrolíticas entre microorganismos de diferentes profundidades na coluna d'água, de diferentes grupos taxonômicos e em relação com o método de isolamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Oceanografia do Atlântico Sul

O Oceano Atlântico é o segundo maior entre os cinco oceanos terrestres, apresentando uma profundidade média de 3.777 metros, com máxima de 8.605 metros. Este oceano é dividido em dois, o Oceano Atlântico Norte e Oceano Atlântico Sul. O Oceano Atlântico Sul, foco deste trabalho, é separado do Oceano Atlântico Norte pela linha do equador e do Oceano Austral pela convergência subtropical, situada em torno de 40^o de latitude sul (DAY, 2006).

A principal feição submarina do Atlântico Sul é a cordilheira meso-oceânica, que o divide em duas partes. Ambas as partes do Atlântico Sul são, por sua vez, separadas por outras cordilheiras menores e feições submarinas incluindo a Elevação do Rio Grande, no lado americano do Atlântico Sul, que separa as bacias da Argentina e do Brasil, e a cordilheira Walvis, no lado africano, que separa duas grandes bacias oceânicas, de Angola e do Cabo (LEVIN; GOODAY, 2003).

A Elevação do Rio Grande constitui um monte submarino, contínuo à cordilheira meso-oceânica. Localiza-se na planície abissal da parte oeste do Oceano Atlântico Sul, na área delimitada pelas latitudes 28^o – 33^oS e as longitudes 29^o – 39^oW, elevando-se até 3.200m do assoalho oceânico (KUMAR, 1979). Em geral esta feição marinha é descrita como uma cordilheira assísmica, originada no final do cretáceo, porém apenas basaltos de outras épocas foram até então recuperados deste local (MOHRIAK et al., 2010).

A cordilheira Walvis é uma feição submarina descontínua que intercepta a margem continental africana na latitude de 20^oS, estendendo-se

até a cordilheira meso-oceânica, a 37°S. Sua composição é característica de crosta oceânica, com o dobro da espessura normal, em torno de 12 a 15 km (HEKINIAN, 1974; SALTERS; SACHI-KOCHER, 2010). A origem da cordilheira Walvis ainda é debatida, mas parece estar associada à interação do “hot spot” Tristão da Cunha com o movimento da placa tectônica subjacente. Acredita-se que esta cordilheira assísmica represente o início de uma trilha de “hot spot” em movimento direcionado ao sul, sendo formada a partir da fissura da crosta oceânica, durante o deslocamento das placas tectônicas dos continentes americano e africano (HEKINIAN, 1974; ELLIOTT; BERNDT; PARSON, 2009).

Os movimentos de água do Atlântico Sul (Figura 1) são dominados, em larga escala, pelo deslocamento em direção ao norte de água superficial e intermediária derivada dos oceanos Índico e Pacífico. Esta massa de água irá formar, juntamente com outras massas de água derivadas do norte, a Água Profunda do Atlântico Norte (*North Atlantic Deep Water*, NADW) que se desloca em direção ao sul pelo Atlântico Sul, eventualmente retornando para os oceanos Índico e Pacífico (LEVIN; GOODAY, 2003).

Abaixo da NADW, a Água de Fundo do Antártico (*Antartic Bottom Water*, AABW) flui em direção ao norte no Atlântico Sul, pelas bacias da Argentina e do Brasil. Esta massa de água caracteriza-se por baixa temperatura e salinidade, e pelas altas concentrações de nutrientes e oxigênio. Da bacia do Brasil, a AABW pode retornar pela Zona de Fraturas Romanche para as bacias do leste do Atlântico Sul (LEVIN; GOODAY, 2003).

A maior parte dos sedimentos do Oceano Atlântico Sul é de origem terrígena ou pelágica (ODADA, 1990). Em torno de 67% dos sedimentos superficiais são dominados por vazas de carbonato originadas de

foraminíferos. Na região central as vazas calcáreas são predominantemente originadas de pterópodos (PRICE et al., 1985). As vazas silicosas originadas de diatomáceas compreendem 7% dos sedimentos superficiais, sendo isto um reflexo dos níveis de dissolução e não de deposição. Os principais minerais argilosos de origem terrestre são a caulinita e clorita (JONES, 1984). Os sedimentos autigênicos, como os depósitos de nódulos de manganês e ferro são observados em algumas áreas, principalmente nas bacias da Argentina, do Brasil e do Cabo (LEVIN; GOODAY, 2003).

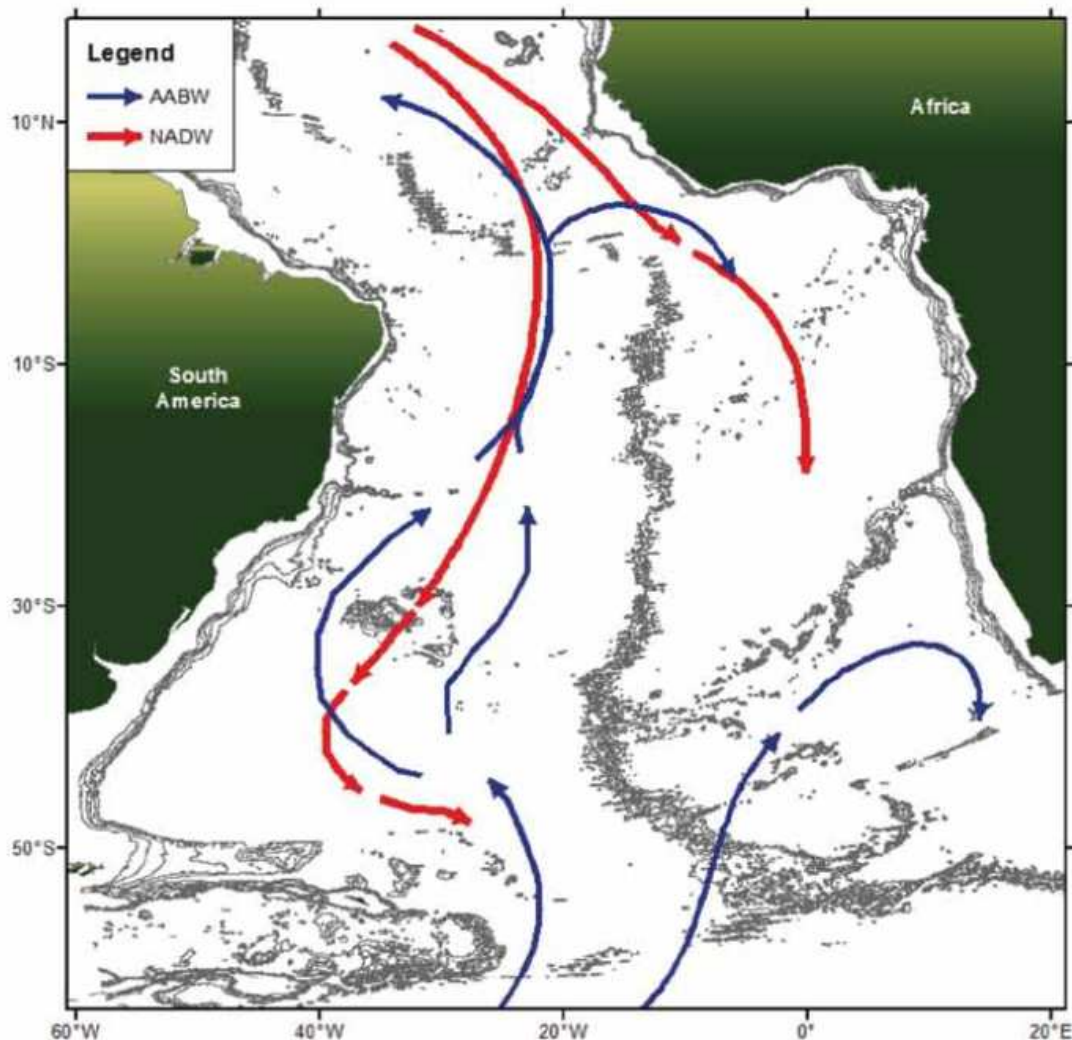


Figura 1. Padrão de circulação de água profunda do Oceano Atlântico Sul. AABW, Água de Fundo do Antártico; NADW, Água Profunda do Atlântico Norte.

2.2 Métodos de Estudo da Diversidade Microbiana

O estudo da diversidade microbiana é realizado por métodos dependentes e independentes de cultivo. Nos métodos que envolvem cultivo, a amostra é inoculada em um ou mais meios de cultura e, após a incubação, os micro-organismos são isolados e posteriormente identificados. O cultivo pode ou não envolver o enriquecimento, sendo este empregado quando se busca algum tipo específico de micro-organismo. A identificação das culturas bacterianas obtidas é normalmente realizada pela análise molecular, através da amplificação e sequenciamento de genes conservados, como os que codificam a molécula de RNA ribossômico 16S e as enzimas girase e RecA. Entretanto, outros métodos podem ser utilizados, incluindo a análise de perfis de ácidos graxos e métodos mais tradicionais como testes bioquímicos e morfológicos. Preconiza-se que a caracterização idealizada de culturas microbianas seja realizada de forma polifásica, isto é, através da combinação de diferentes metodologias (GILLIS et al., 2001).

Nos métodos independentes de cultivo é feita a análise do DNA extraído dos micro-organismos de uma comunidade, sem que eles sejam primeiramente cultivados. Uma das principais técnicas independentes de cultivo envolve a extração de DNA genômico da comunidade, a amplificação e o sequenciamento dos genes que codificam o RNA ribossômico 16S, para procariotos, ou 18S, para eucariotos (TRINGE; RUBIN, 2005). A grande vantagem dos métodos independentes de cultivo é a possibilidade de obter-se um panorama mais completo da composição das comunidades microbianas nos diferentes ecossistemas, uma vez que muitos dos micro-organismos

existentes não são passíveis de serem cultivados por métodos empregados rotineiramente ou conhecidos até o momento. Estima-se, por exemplo, que apenas 1% dos procariotos presentes em amostras marinhas pelágicas seja cultivável pelos métodos empregados tradicionalmente (FUHRMAN; HAGSTRÖM, 2008).

Considerando a ineficácia dos métodos dependentes de cultivo em descrever as comunidades microbianas, qual o propósito de estudos que se baseiam nestas metodologias? Primeiramente, os estudos independentes de cultivo são mais limitados em descrever a fisiologia dos micro-organismos detectados nas amostras. Através da metagenômica é possível inferir características dos organismos cujos genes foram detectados por métodos independentes de cultivo (LÜCKERA et al., 2010), mas o estudo de culturas microbianas permite uma compreensão mais completa da fisiologia e, eventualmente, da função ecológica dos micro-organismos detectados.

O estudo de culturas microbianas também permite que hipóteses criadas a partir de estudos genômicos sejam testadas. Como exemplo, a descoberta da proteína proteorodopsina em fragmentos de genomas de micro-organismos marinhos não cultivados pode ser citada (BÉJÀ et al., 2000). Proteínas similares a esta, que permitem a geração de força próton-motora pela absorção de luz, são conhecidas há certo tempo em áqueas halófilas, porém sua descrição em bactérias marinhas somente ocorreu no ano 2000 por Béjà e colaboradores. Posteriormente, através do estudo de bactérias cultivadas do filo Bacteroidetes, capazes de produzir a proteorodopsina, foi demonstrada a geração de força próton-motora suficiente para a síntese de ATP. Isto permitiu comprovar que este processo fototrófico pode funcionar

como uma fonte alternativa de energia para muitos dos micro-organismos marinhos que habitam o ambiente pelágico (YOSHIZAWA et al., 2012).

Finalmente os métodos dependentes de cultivo são essenciais para a descrição de novas espécies, que baseia-se no estudo polifásico de culturas axênicas (KRIEG, 2001), e para a prospecção de micro-organismos de interesse biotecnológico (BHATNAGARA; KIM, 2012). Apesar dos métodos independentes de cultivo serem cada vez mais utilizados na prospecção de enzimas e outras moléculas microbianas (LI; QIN, 2005; LI et al., 2009), a obtenção de culturas torna muito mais fácil o estudo e a produção em escala laboratorial e industrial destas moléculas.

2.3 Bactérias Marinhas Cultiváveis

A maioria das bactérias marinhas heterotróficas facilmente cultivadas pertence a cinco grupos filogenéticos principais (Figura 2), sendo eles as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, ambas do filo Proteobacteria, o filo Bacteroidetes, também conhecido como *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, e os dois filios contendo micro-organismos Gram-positivos, Actinobacteria e Firmicutes. Dentro destes ramos filogenéticos principais existem vários grupos distintos, alguns mais frequentemente relatados do que outros (FUHRMAN; HAGSTRÖM, 2008).

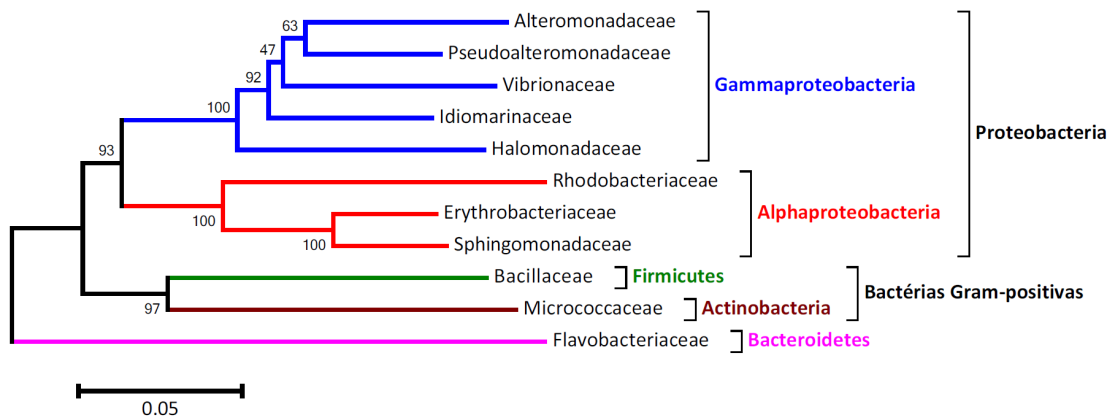


Figura 2. Dendrograma mostrando a relação evolutiva entre os principais grupos filogenéticos (nomes em cores) de bactérias marinhas cultiváveis. A barra representa a distância evolutiva. Os valores de bootstrap (ramificações) se referem a 1000 replicações. A árvore foi construída a partir de sequências parciais e totais de genes 16S de representantes de cada família exibida, depositadas no GenBank e alinhadas utilizando o algoritmo Muscle, Software Mega5.

A classe Alphaproteobacteria é representada no ambiente marinho por três famílias principais, Rhodobacteriaceae, Sphingomonadaceae e Erythrobacteriaceae. Os micro-organismos marinhos da família Rhodobacteriaceae pertencem ao bem estabelecido grupo “*Roseobacter*”. As bactérias deste grupo estão entre os micro-organismos mais abundantes dos oceanos e constituem um dos poucos exemplos de organismos encontrados e identificados em estudos dependentes ou independentes de cultivo (WAGNER-DÖBLER; BIEBL, 2006). O grupo “*Roseobacter*” inclui mais de 38 gêneros (BRNKHOFF et al., 2008) e chega a perfazer até 25% do bacterioplâncton costeiro (TANG et al., 2010), sendo abundante também em águas oceânicas superficiais, mas menos encontradas em águas profundas. Os micro-organismos deste grupo podem estar associados com algas e fitoplâncton, tendo sido encontrados também no gelo polar, em sedimentos e associados

aos animais marinhos (WAGNER-DÖBLER; BIEBL, 2006; BRNKHOFF et al., 2008). O gênero *Sulfitobacter* é um dos que compõem o grupo “*Roseobacter*”. Este gênero foi descrito em 1995 a partir de duas bactérias isoladas da interface entre as camadas óxica e anóxica do Mar Negro, sendo amplamente distribuído em ambientes costeiros e oceânicos, podendo atuar no ciclo orgânico do enxofre (SOROKIN, 1995).

Entre os dois gêneros marinhos da família Erythrobacteriaceae, *Erythrobacter* tem sido frequentemente encontrado em ambientes pelágicos. Estes micro-organismos caracterizam-se pela produção de colônias com coloração vermelha, laranja ou amarela, associada à produção de carotenóides e, em algumas espécies, de bacterioclorofila-a (DENNER et al., 2002). Estes organismos têm sido associados com águas mais eutróficas (BLAZINA et al., 2009), incluindo estuarinas (FRETTE et al., 2004), e encontrado em várias profundidades (EILERS et al., 2001; MA et al., 2009).

A bactéria *Sphingopyxys alaskensis* tem sido o mais bem estudado micro-organismo marinho da família Sphingomonadaceae. Esta bactéria foi originalmente isolada de águas costeiras do Alaska em um procedimento visando o cultivo de organismos especialmente adaptados às condições oligotróficas do ambiente marinho (SCHUT et al., 1993). Estes mecanismos adaptativos, como o tamanho reduzido, e as respostas fisiológicas a falta de nutrientes e a outras formas de estresse foram revisadas por Cavicchioli et al. (2003).

Gammaproteobacteria é a maior classe do filo Proteobacteria, sendo formada por mais de 180 gêneros e 750 espécies até 2006. Fenotipicamente os organismos da classe Gammaproteobacteria podem ser divididos em

fototróficos anoxigênicos, organotróficos e litotróficos oxidantes do enxofre e do ferro (KERSTERS et al., 2006). Entretanto, os principais representantes marinhos desta classe são organotróficos e geralmente pertencem a três ordens: Vibrionales, Alteromonadales e Oceanospirillales (BRENNER et al., 2005).

A ordem Vibrionales inclui os micro-organismos popularmente conhecidos como vibrios. Estas bactérias pertencem a vários gêneros, sendo *Vibrio* e *Photobacterium* os mais conhecidos. Uma característica marcante dos vibrios é a sua associação com animais marinhos. Em muitos casos esta relação é comensal, porém muitas espécies são patógenos de peixes e invertebrados marinhos incluindo moluscos, crustáceos e corais (THOMPSON et al., 2004). Por outro lado, espécies bioluminescentes como *Aliivibrio fischeri* estabelecem relações mutualísticas com peixes e cefalópodes (GUERRERO-FERREIRA et al., 2013). Finalmente muitas espécies podem ser patógenos humanos, sendo *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* as mais importantes em relação à severidade da doença e ao número de casos relatados (IGBINOSA; OKOH, 2008). Os vibrios são organismos frequentemente encontrados em ambientes costeiros, não sendo comuns em ecossistemas oceânicos. Entretanto algumas espécies do gênero *Photobacterium* (SEO et al., 2005; AST et al., 2007) e linhagens do gênero *Vibrio* (HOFFMANN et al., 2010) já foram relatadas em ambientes marinhos profundos.

Assim como os vibrios, os micro-organismos da ordem Alteromonadales estão entre os mais frequentemente isolados do ambiente marinho. Diferentemente dos vibrios, as bactérias da ordem Alteromonadales

são frequentemente encontradas em ambientes oceânicos, em todas as profundidades e nos sedimentos (MIKHAILOV et al., 2006). *Alteromonas* é um dos gêneros mais estudados desta ordem. Estes organismos não só são amplamente distribuídos no ambiente marinho, como podem ser dominantes em “florações” de micro-organismos heterotróficos (MATH et al., 2012). A espécie *Alteromonas macleodii* tem sido particularmente estudada devido a sua diferenciação em ecotipos adaptados a ambientes profundos e superficiais (IVARS-MARTINEZ et al., 2008; SMEDILE et al., 2013), sendo caracterizada pela absorção de uma grande variedade de substratos e por sua importância em agregados orgânicos ou materiais particulados em suspensão (ACINAS et al., 1999).

O gênero *Pseudoalteromonas*, derivado de *Alteromonas*, é frequentemente dominante entre os micro-organismos cultivados a partir de diversas amostras marinhas como, por exemplo, no Mar de Bering (ZENG et al., 2012) e em águas oligotróficas do Mar Adriático (BLAZINA et al., 2009). As 37 espécies deste gênero são normalmente divididas em dois grupos, sendo o primeiro dos organismos pigmentados, normalmente produtores de moléculas bioativas, e o segundo das espécies não pigmentadas, que normalmente apresentam tolerância maior às variações no ambiente (XIE et al., 2012).

O gênero *Idiomarina* foi originalmente descrito a partir de linhagens isoladas de água marinha profunda (IVANOVA et al., 2000). A partir de dados genômicos foi sugerido que a espécie *Idiomarina loihiensis*, descrita a partir do isolamento realizado em um monte submarino profundo localizado no Hawaii (DONACHIE et al., 2003), coloniza partículas protéicas, com o auxílio de exopolissacarídeos e de peptidases que permitem a utilização destes

polímeros como fonte de carbono e energia (HOU et al., 2004). Lu et al. (2011) relatam que o gênero *Idiomarina* estava entre os cinco gêneros dominantes entre os isolados obtidos de amostras do Mar do Leste da China.

Marinobacter é outro gênero frequentemente encontrado em ecossistemas marinhos profundos, tanto em águas frias como quentes, sendo estas associadas com fontes hidrotermais submarinas. Nestes locais foi sugerido que as bactérias do gênero *Marinobacter* possam atuar como organismos litotróficos facultativos, obtendo energia da oxidação de íons ferrosos (KAYE et al., 2011). Estes micro-organismos também foram observados em associação com outros organismos marinhos, especialmente com o fitoplâncton. A aquisição de ferro tem sido estudada em *Marinobacter* e foi sugerido que estes organismos tornam este elemento disponível para o fitoplâncton (AMIM et al., 2012).

O filo Bacteroidetes compreende 15 famílias divididas em quatro classes (KRIEG et al., 2010) e é um dos filios de bactérias heterotróficas mais abundantes em ambientes marinhos (DÍEZ-VIVES et al., 2012). A maioria dos organismos deste filo, cultivados de amostras marinhas, pertence à família Flavobacteriaceae, da classe Flavobacteriia. O'Sullivan e colaboradores (2006), por exemplo, observaram que 93% de 55 isolados do filo Bacteroidetes pertenciam à família Flavobacteriaceae.

Alguns membros da família Flavobacteriaceae são especialmente capazes de degradar polissacarídeos complexos e outras macromoléculas. Na espécie *Zunongwangia profunda*, por exemplo, foi demonstrada experimentalmente a capacidade de hidrolisar a gelatina, a caseína e os lipídeos Tween20, 40 e 80, tendo sido detectados no seu genoma genes que

codificam cinquenta e duas peptidases, xilanases, quitinase, glucosidases, sete lipases, vinte esterases e duas endonucleases (QIN et al., 2007; 2010). Por causa disto, foi sugerido que estes micro-organismos teriam a função ecológica de degradar compostos de alto peso molecular, sendo este processo um passo limitante na mineralização da matéria orgânica.

Ambos os filos de bactérias Gram-positivas, Firmicutes e Actinobacteria, são comuns em amostras marinhas. Os micro-organismos cultivados destes dois filos são normalmente mais frequentemente encontrados em amostras de sedimentos (GONTANG et al., 2007), sendo às vezes os organismos mais significantes, como exemplificado por Velmurugan e colaboradores (2011) em amostras de sedimento do sul da Coreia, nas quais micro-organismos do filo Firmicutes compreenderam em torno de 57% dos isolados obtidos.

As bactérias formadoras de endósporos são os principais representantes marinhos do filo Firmicutes. O gênero *Bacillus* parece ser o mais amplamente distribuído, porém outros gêneros como *Paenibacillus* e *Sporosarcina* são também frequentemente relatados (YOON et al., 2001; GONTANG et al., 2007; LEE et al., 2012a). Foi sugerido que grande parte das bactérias formadoras de endósporos detectadas no ambiente marinho não é autóctone, sendo provenientes de ambientes terrestres ou de água doce (BELENEVA, 2008). Porém, várias espécies comprovadamente marinhas já foram descritas a partir de uma grande variedade de amostras. *Bacillus oceanisediminis* e *Paenibacillus oceanisediminis* são dois exemplos de bactérias formadoras de endósporos marinhas, isoladas de sedimentos da costa da Coreia (LEE et al., 2012b)

Assim como as bactérias formadoras de endósporos, muitos micro-organismos do filo Actinobacteria relatados no ambiente marinho podem ter uma origem terrestre, apesar de espécies comprovadamente marinhas terem sido descritas (PRIETO-DAVO et al., 2013). Entre as actinobactérias de origem marinha, várias apresentam morfologia de cocos, sendo taxonomicamente relacionadas ao gênero *Micrococcus*. Um exemplo é o gênero *Kytococcus*. A linhagem da espécie tipo deste gênero, *Kytococcus sedentarius*, foi originalmente isolada de amostras de biofilme marinho (STACKEBRANDT et al., 1995), tendo sido descrita posteriormente como membro da microbiota da pele (SIMS et al., 2009) e de sedimentos de um manguezal (DIAS et al., 2009). Micro-organismos do gênero *Nesterenkonia*, outro gênero relacionado com *Micrococcus*, também foram relatados por Dias e colaboradores (2009) em sedimentos de manguezal.

O próprio gênero *Micrococcus* inclui micro-organismos frequentemente cultivados de amostras marinhas. A espécie *Micrococcus luteus* foi encontrada em sedimentos marinhos, apesar de normalmente estar associada com a microbiota humana. Foi demonstrado que uma linhagem desta espécie pode interagir positivamente com micro-organismos do sedimento, facilitando a sua absorção de ferro pela produção de sideróforos. Esta interação foi utilizada como base para novos procedimentos de cultivo que permitiram o isolamento de novos micro-organismos do sedimento (D'ONOFRIO et al., 2010).

2.4 Bioprospeção de Enzimas em Micro-organismos Marinhos

Os micro-organismos marinhos têm sido intensamente estudados como produtores de moléculas de uso industrial. Entre as moléculas que podem ser obtidas de micro-organismos, as enzimas têm recebido atenção especial, uma vez que podem ser utilizadas em diversos ramos industriais que incluem a suplementação de rações para animais (SALEM et al., 2013), a produção de detergentes (NERURKAR et al., 2013), a produção de biocombustíveis (TAN et al., 2010) e muitas outras.

As enzimas provenientes de micro-organismos marinhos podem ser novas ou podem apresentar propriedades que as distinguem das enzimas produzidas por organismos terrestres. Estas propriedades incluem a alta tolerância a salinidade, termoestabilidade, atividade em baixas temperaturas e em altas pressões, características normalmente associadas com condições ambientais observadas nos ecossistemas marinhos (DEBASHISH et al., 2005).

As enzimas que catalisam a hidrólise de lipídeos podem ser de dois tipos, as esterases e as lipases verdadeiras. As esterases catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos de cadeia curta que são solúveis em água, enquanto que as lipases verdadeiras catalisam a hidrólise e a síntese de acilgliceróis de cadeia longa. A atividade hidrolítica das lipases verdadeiras se dá na interface do meio aquoso com o não aquoso, enquanto que a síntese ocorre somente em meio não aquoso (KARPUSHOVA et al., 2005). Apesar desta diferenciação, as lipases verdadeiras são extremamente versáteis e apresentam, às vezes, atividade similar às esterases (LOTTI; ALBERGHINA, 2007), o que pode dificultar sua diferenciação. Ambos os tipos de enzimas estão entre as principais estudadas em bactérias marinhas, e neste trabalho elas serão denominadas coletivamente de lipases.

A produção de lipases é observada em vários grupos de micro-organismos marinhos. Yu et al. (2009), por exemplo, relataram que organismos de cinco grupos filogenéticos distintos apresentaram atividade lipolítica, sendo eles as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, e os filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria. Dang et al. (2009), por outro lado, relataram atividade lipolítica apenas em bactérias da classe Gammaproteobacteria e do filo Actinobacteria apenas.

Uma das características mais visadas em lipases de micro-organismos marinhos é a adaptação ao frio. Este tipo de enzima foi encontrado em uma linhagem de *Pseudoalteromonas* isolada de krill, que mantinha de 20 a 50% da sua atividade máxima (observada a 35⁰C) entre as temperaturas de 0 e 20⁰C (CIEMLIJSKI et al., 2007). Ryu e colaboradores (2006) relataram a produção de outra lipase adaptada ao frio em uma nova espécie de bactéria, *Photobacterium lipolyticum*, isolada de sedimentos de uma planície de maré. A atividade ótima desta enzima foi a 25⁰C, sendo que ela permaneceu ativa a temperatura de 5⁰C.

A produção de enzimas adaptadas ao frio também foi relatada em micro-organismos de ambientes marinhos profundos. Zhang e Zeng (2008) relataram o isolamento e caracterização de uma lipase adaptada ao frio de uma linhagem de *Pseudomonas* obtida de uma amostra de sedimento marinho coletada a 900m. A atividade ótima desta enzima foi a 30⁰C, porém, ela se manteve ativa em uma faixa de 0 a 50⁰C. Por outro lado, Jeon e colaboradores (2008) obtiveram uma lipase adaptada ao frio a partir de um metagenoma de sedimento marinho profundo (1.440m). Esta enzima apresentou 50% da atividade a 5⁰C, sendo o ótimo a 30⁰C.

As celulases constituem um grupo de enzimas que atuam na degradação da celulose. De maneira geral, três tipos de enzimas são necessários para a completa hidrólise da celulose. O primeiro tipo é o das β 1,4-endoglicanases, que atuam nas partes internas amorfas das fibras de celulose, sendo normalmente detectado pela hidrólise de carboximetilcelulose, (CMC) uma forma mais solúvel de celulose. O segundo tipo é o das β 1,4-exoglicanases, que atuam nas terminações da cadeia de celulose, liberando principalmente celobiose (WILSON, 2011). O terceiro tipo é o das celobiasas, ou β -glicosidases, que hidrolisam a celobiose, liberando duas moléculas de glicose (ZHANG et al., 2011).

Apesar da celulose não ser um polímero comum no ambiente marinho, várias bactérias marinhas são capazes de produzir enzimas celulolíticas (Tabela 1). Estas bactérias pertencem a cinco grupos filogenéticos distintos, dois contendo micro-organismos Gram-positivos (Actinobacteria e Firmicutes), e três de bactérias Gram-negativas (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Thermotogae). A classe Gammaproteobacteria aparentemente é o grupo com maior diversidade. Por outro lado, o gênero *Bacillus*, do filo Firmicutes, é o que apresenta um maior número de espécies distintas com atividade celulolítica. A espécie *Thermotoga maritima*, do filo Thermotogae, é a única hipertermófila, tendo sido isolada de fontes hidrotermais submarinas (BRONNENMEIER et al., 1995). Ao menos catorze gêneros de bactérias marinhas, dos cinco grupos filogenéticos, produzem algum tipo de celulase, que podem variar em relação à temperatura e atividade catalítica sobre diferentes substratos.

Tabela 1: Espécies e gêneros de bactérias marinhas nas quais a atividade celulolítica já foi relatada, e os grupos filogenéticos aos quais elas pertencem.

Micro-organismo	Grupo Filogenético	Referência
<i>Microcella</i>	Actinobacteria	Kobayashi et al., 2008
<i>Streptomyces</i>	Actinobacteria	Ramesh e Mathivanan, 2009
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	Firmicutes	Hirasawa et al., 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Firmicutes	Nurachaman et al., 2010
<i>Bacillus flexus</i>	Firmicutes	Trivedi et al., 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	Annamalai et al., 2011
<i>Bacillus stratosphericus</i>	Firmicutes	Odisi et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	Kim et al., 2009
<i>Paenibacillus</i> sp.	Firmicutes	Fu et al., 2010
<i>Martellella mediterranea</i>	Alphaproteobacteria	Dong et al., 2010
<i>Halomonas salaria</i>	Gammaproteobacteria	Huang et al., 2010
<i>Marinobacter</i> sp.	Gammaproteobacteria	Shanmughapriya et al., 2010
<i>Pseudoalteromonas</i>	Gammaproteobacteria	Kobayashi et al., 2008
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Gammaproteobacteria	Garsoux et al., 2004
<i>Pseudomonas</i>	Gammaproteobacteria	Kobayashi et al., 2008
<i>Psychrobacter aquimaris</i>	Gammaproteobacteria	Kim et al., 2011
<i>Saccharophagus degradans</i>	Gammaproteobacteria	Zhang et al., 2011
<i>Teredinibacter turnirae</i>	Gammaproteobacteria	Ahuja et al., 2004
<i>Vibrio</i> sp.	Gammaproteobacteria	Gao et al., 2010
<i>Thermotoga maritima</i>	Thermotogae	Bronnenmeier et al., 1995

A atividade celulolítica dos micro-organismos marinhos é bastante variável. A maioria dos micro-organismos apresenta atividade β 1,4-endoglicanase, sobre a CMC, e capacidade de hidrolisar a celobiose, como exemplificado por *Bacillus agaradhaerens* (HIRASAWA et al., 2006) e *Bacillus subtilis* (KIM et al., 2009). As espécies *Teredinibacter turnirae* (AHUJA et al., 2004), *Thermotoga marítima* (BRONNENMEIER et al., 1995) e *Psychrobacter aquimaris* (KIM et al., 2011), por outro lado, apresentam atividade celulolítica sobre CMC e Avicel, evidenciando tanto a atividade de β 1,4-endoglicanases quanto de β 1,4-exoglucanases. Finalmente, a bactéria *Saccharophagus degradans* é notável por produzir 13 diferentes β 1,4-endoglicanases, celobiases associadas ao envelope celular e citoplasmáticas, e atividade sobre

Avicel, apesar de genes que codificam β 1,4-exoglicanases não terem sido identificados no seu genoma (ZHANG et al., 2011).

Nas bactérias marinhas celulolíticas já estudadas, a temperatura ótima para a atividade celulolítica varia entre 30 e 60⁰C. *T. marítima* é uma bactéria atípica neste sentido, uma vez que a temperatura ótima para sua atividade celulolítica é de 90⁰C, sendo esta ausente abaixo de 50⁰C, condizente com o fato deste micro-organismo habitar fontes hidrotermais submarinas (BRONNENMEIER et al., 1995). Em alguns casos, como em *Bacillus flexus* (TRIVEDI et al., 2011), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (GARSOUX et al., 2004) e *Paenibacillus* sp. (FU et al., 2010), as enzimas podem exibir atividade ou permanecer estáveis em temperaturas de 4 a 5⁰C. Excetuando-se *P. haloplanktis*, que é proveniente de águas antárticas, não existe uma relação clara entre a origem destes micro-organismos e sua atividade em baixas temperaturas. Entretanto, o número baixo de bactérias estudadas impossibilita qualquer generalização, o que demonstra a necessidade de mais estudos sobre micro-organismos marinhos celulolíticos e a influência de parâmetros como a temperatura, sobre sua atividade celulolítica.

2.5 Diversidade Microbiana na Região da Elevação do Rio Grande e no Leste do Oceano Atlântico Sul

Existem poucos estudos focados na diversidade microbiana do Oceano Atlântico Sul, e em particular, na sua parte leste e na região da Elevação do Rio Grande. Petermann e Bleil (1993), por exemplo, estudaram bactérias magnetotáticas em sedimentos do leste do Atlântico Sul, incluindo

amostras da Cordilheira Walvis e da Planície Abissal do Cabo. Estes micro-organismos apresentavam certa diversidade morfológica e foram observados apenas nas camadas superficiais do sedimento, porém em regiões específicas, livres de oxigênio.

Schauer e colaboradores (2010) estudaram as comunidades de micro-organismos não cultivados de sedimentos de três bacias oceânicas, incluindo amostras das planícies abissais do Cabo e de Angola. Os micro-organismos da Classe Gammaproteobacteria foram os dominantes, sendo observados nas três bacias oceânicas, assim como os organismos das classes Deltaproteobacteria e do filo Acidobacteria. Vários outros grupos filogenéticos foram observados, incluindo as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, e os filos Chloroflexi, Bacteroidetes e Planctomycetes.

Morris et al. (2012) estudaram a distribuição de quatro grupos filogenéticos de bactérias (clado SAR11, Actinobacteria, clado OCS116 e “*Roseobacter*”) em amostras planctônicas do Atlântico Sul. O grupo SAR11 foi o dominante, tanto no lado leste quanto no lado oeste do Atlântico Sul, enquanto que Actinobacteria, OCS116 e “*Roseobacter*” estavam associados com o fitoplâncton, apresentando uma abundância máxima na região que apresentou maior concentração de clorofila.

Friedline et al. (2012) também estudaram as comunidades de bactérias de águas de todo o leste do Atlântico, incluindo o Atlântico Sul. O filo dominante foi Proteobacteria, sendo a classe Alphaproteobacteria a mais frequentemente identificada. O gênero *Alteromonas* (classe Gammaproteobacteria) foi um dos mais abundantes, perfazendo 3% das sequências amostradas. Cyanobacteria representou 10% das sequências e

incluíram os gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus*. Outros filos detectados foram Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria e Firmicutes. A análise dos dados permitiu inferir que estas comunidades estão estratificadas na coluna d'água, associadas com massas de água caracterizadas por determinadas variáveis ambientais como temperatura, salinidade e nutrientes.

Os micro-organismos cultiváveis foram estudados por Wang e colaboradores (2010) e Odisi e colaboradores (2012). Wang et al. (2010) estudaram a diversidade dos genes que codificam as enzimas alceno hidrolases, envolvidas na degradação de hidrocarbonetos, em bactérias isoladas de amostras pelágicas do Oceano Atlântico, incluindo amostras coletadas na região da cordilheira meso-oceânica e no parte leste do Atlântico Sul. Foram estudadas 177 linhagens de bactérias, que incluíram os gêneros *Alcanivorax*, *Erythrobacter*, *Idiomarina*, *Bacillus*, *Martella*, *Parvibaculum* e *Salinisphaera*, entre outros.

Finalmente, Odisi et al. (2012) relataram a prospecção de micro-organismos celulolíticos e lipolíticos de amostras de água e sedimento do Atlântico Sul. Dos 161 micro-organismos analisados, 40 apresentaram atividade celulolítica, 23 apresentaram atividade lipolítica e apenas 5 hidrolisaram lipídeos e celulose, sendo estes organismos mais comuns no sedimento. Três dos isolados foram selecionados e identificados nas espécies *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus aerophilus* e *Bacillus pumilus*.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1: Phylogenetic Identification of Marine Bacteria Isolated from Deep-Sea Sediments of the Eastern South Atlantic Ocean

Artigo publicado no periódico "SpringerPlus"

Phylogenetic Identification of Marine Bacteria Isolated from Deep-Sea Sediments of the Eastern South Atlantic Ocean

Marcus Adonai Castro da Silva¹; Angélica Cavalett¹; Ananda Spinner¹; Daniele Cristina Rosa¹; Regina Beltrame Jasper¹; Maria Carolina Quecine³; Maria Letícia Bonatelli³; Aline Pizzirani-Kleiner³; Gertrudes Corção²; André Oliveira de Souza Lima¹.

¹*Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, CEP 88302202, Itajaí-SC, Brazil.*

²*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Cidade Baixa, CEP 90050-170 Porto Alegre-RS, Brazil.*

³*Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-260 Piracicaba-SP, Brasil*

Corresponding author: M. A. C. da SILVA. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, CEP 88302202, Itajaí-SC, Brazil. E-mail: marcus.silva@univali.br

Abstract

The deep-sea environments of the South Atlantic Ocean are less studied in comparison to the North Atlantic and Pacific Oceans. With the aim of identifying the deep-sea bacteria in this less known ocean, 70 strains were isolated from eight sediment samples (depth range between 1905 to 5560m) collected in the eastern part of the South Atlantic, from the equatorial region to the Cape Abyssal Plain, using three different culture media. The strains were classified into three phylogenetic groups, Gammaproteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria, by the analysis of 16s rRNA gene sequences. Gammaproteobacteria and Firmicutes were the most frequently identified groups, with *Halomonas* the most frequent genus among the strains. Microorganisms belonging to Firmicutes were the only ones observed in all samples. Sixteen of the 41 identified operational taxonomic units probably represent new species. The presence of potentially new species reinforces the need for new studies in the deep-sea environments of the South Atlantic.

KEYWORDS: Deep-sea sediments; South Atlantic Ocean; Phylogenetic identification; Cultivable bacteria; Halomonas

Background

Deep-sea environments are the largest continuous ecosystems on our planet. Except for specific places considered diversity hot spots, such as hydrothermal vents and cold seeps, other deep-sea environments including the abyssal plains are in most cases scarcely studied (Jørgensen and Boetius 2007).

The abyssal plains are located between 3000 and 5000 meters deep, and cover 54% of the planet's surface. A big part of this region is covered with biogenic sediments, although hard substrata such as manganese nodules may be found in some places. Characteristically, the biota of abyssal plains is limited by food, since this environment is devoid of primary production and depends on the input of organic matter from surface waters. Because of its extent and difficulty of access, the abyssal plains are among the least understood ecosystems of our planet, despite the great diversity that these environments may harbor (Smith et al. 2008).

Most of the research on microbial diversity conducted on sediment samples from abyssal plains are based on cultivation-independent methods, which are considered more appropriate, since they allow the detection of the non-cultivable microorganism that are generally constitute the largest fraction of the total microbial community (Polymenakou et al. 2009; Schauer et al. 2010). However, cultivation-based studies may provide information on the physiological characteristics of the organisms living in the sediments, and allow the description of new species and the prospecting for microorganisms of biotechnological interest (Zengler et al. 2002; Pettit 2011). Gärtner et al. (2011) isolated and identified 107 bacteria from deep sediments of the Mediterranean Sea, and most of the strains belonged to two phylogenetic groups, Firmicutes and Actinobacteria. The most frequently identified genus was *Bacillus*, and 13 possibly new species were also detected. Most of the isolated strains were capable of growing under conditions similar to those prevailing at the source of the samples, relating to temperature and nutrient concentrations.

Aiming to find microorganisms with potential for lipase production, Zeng et al. (2004) isolated lipolytic microorganisms from samples of deep marine sediments from the Eastern Pacific Ocean. Most of the bacteria isolated belonged to the genera *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Pseudalteromonas* of Gammaproteobacteria. Some of the strains produced several types of hydrolytic enzymes, which demonstrated the potential of microorganisms from deep-sea sediments.

The Atlantic Ocean is younger and less tectonically active than the Pacific Ocean. The mid-oceanic ridge is the most important feature of the Atlantic Ocean, and separates it in two halves. Each half of the South Atlantic is further separated in other basins by smaller ridges and other features. On the eastern side, which is the focus of this work, two features are important, the Romanche Trench, in the equatorial region, and the Walvis Ridge, located further south. Between these features is the Angola Abyssal Plain and, south of the Walvis Ridge, the Cape Abyssal Plain (Levin and Gooday 2003).

The Walvis Ridge is a discontinuous submarine feature that intercepts the African continental margin at a latitude of 20°S, extending to the mid-ocean ridge at 37°S. The Walvis Ridge has a characteristic oceanic crust composition, with twice the normal thickness, about 12 to 15 km (Hekinian 1974; Salters and Sachi-Kocher 2010). The origin of the Walvis Ridge is still in debate, but it seems to be associated with the interaction of the Tristão da Cunha hot spot and the movement of the overlying tectonic plate. It is believed that this aseismic ridge represents the beginning of a hot spot trail with southward movement, formed from a fissure of the oceanic crust during the movement of the American and African tectonic plates (Hekinian 1974; Elliott et al. 2009).

The Angola and Cape Abyssal Plains are separated by the Walvis Ridge, which functions as a barrier that limits the water flow between these two oceanic basins. The North Atlantic Deep Water, which originates in the Arctic, dominates the Angola Basin. The sediments in this region are typical of deep-sea environments, comprising mainly siliceous and calcareous microfossils. The Low Circumpolar Deep Water, which originates in the Antarctic continent, dominates the Cape Basin (Jansen et al. 1984; Schauer et al. 2010). All these features may influence the distribution of microbial species living in the sea floor and at the deep-sea ecosystems in general.

The deep-sea environments are less studied concerning their microbial diversity, in comparison to other ecosystems, and this applies to the South Atlantic. Recently, Schauer et al. (2010) studied microbial diversity and its biogeography in some basins of the Eastern South Atlantic. These investigators reported the dominance of Proteobacteria, Gammaproteobacteria in particular, in the Guinea, Cape and Angola Basins. Other phylogenetic groups were also identified. The communities of cultivable bacteria were not studied.

In short, there is a paucity of studies on cultivable bacteria from the abyssal plains, despite the importance to biotechnology (Arahal and Ventosa 2006; Simon-Colin et al. 2008; Pettit 2011), for the description of new species and to understand physiological aspects that are relevant to the survival of deep-sea microorganisms. Therefore, the aim of this study was the isolation of microorganisms from sediment samples collected on the abyssal plains of the Eastern South Atlantic Ocean and their phylogenetic identification.

Results

Colony counts of the samples, as determined in MA, varied between 23 and 1.41×10^6 CFU/g of sediment. The number of isolated strains per sample varied between 4 (sample 5) and 15 (sample 1) (Table 1). No tendencies were observed in these counts, in relation to the depth and location of the sampling stations. Seventy microorganisms were isolated from the three culture media employed. Thirty-five were isolated from MA plates, 18 from MA+Tween 40 plates and 17 MA+CMC plates.

According to the partial sequencing of the 16S rRNA gene, the 70 isolated microorganisms were identified as belonging to three phylogenetic groups, Gammaproteobacteria, Firmicutes (Gram-positives with low G+C percentage) and Actinobacteria (Gram-positives with high G+C percentage) (Figures 1 and 2). Most of the strains belonged to Gammaproteobacteria (39 strains) and Firmicutes (27 strains). Only four strains belonged to Actinobacteria. The only phylogenetic group detected in all samples was Firmicutes. Microorganisms from the Gammaproteobacteria class were not detected in sample 5 (sample from 70 cm below the surface of the sediment), in which only Firmicutes were detected. Actinobacteria were detected in samples 1, 3 and 7.

Forty-one different OTUs were defined among the 70 isolated strains (Additional file 1). Sixteen OTUs may represent new species, since they showed less than 97% similarity to sequences in the database / published sequences, each of them containing only one strain. Nineteen OTUs were identified in the Gammaproteobacteria class, with 10 belonging to the genus *Halomonas*. Six OTUs of *Halomonas* may represent new species. Three OTUs

were attributed to *Psychrobacter*, with two representing new species, and three OTUs were related to *Idiomarina*, with two possibly new species.

Eighteen OTUs were identified in Firmicutes, six belonging to *Bacillus* and four to *Staphylococcus*. Two OTUs were related to the genera *Paenibacillus* and two others to *Oceanobacillus*. Five OTUs of Firmicutes may represent new species, belonging to the genera *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* and *Staphylococcus*. Each strain of Actinobacteria represented a different OTU, with one possibly being a new species. Two OTUs of Actinobacteria were related to the genus *Nesterenkonia*.

The number of OTUs per sample reflected in an approximate way the number of strains isolated. A small number of OTUs were identified in samples with a small number of strains. For instance, two OTUs were obtained from sample 5, from which only four strains were obtained. This was the only sample collected below the surface of the sediment (70 cm below the surface). A higher number of strains ($n = 15$) were isolated from sample 1, which also showed the highest number of OTUs. This sample was collected at the Cape Abyssal Plain, at the highest latitude sampled in this study.

Only nine out the 41 identified OTUs were detected in more than one sample (Table 2). The OTUs 7 (related to *Halomonas boliviensis* strain LC1) and 23 (related to *Bacillus aerophilus* strain :28K/*B. altitudinis* strain :41KF2b/*B. stratosphericus* strain :41KF2a) were observed in four samples. The highest numbers of unique OTUs were observed in samples 1 and 6 ($n = 8$ and 6). No unique OTUs were observed in sample 5.

By cluster analysis, the samples could be separated into three groups (Figure 3). The first group comprised samples 2 (Angola Abyssal Basin) and 7

(South Equatorial Region), both originating from further north. The second group included samples 3 (Cape Abyssal Plain) and 6 (Angola Abyssal Basin). Finally, the third group comprised samples 1, 4, 5 (all originating from the Cape Abyssal Plain) and 8 (Walvis Ridge Region). Most of the samples collected south of the Walvis Ridge (except sample 3), were in the third group of the cluster. This group also included samples 4 and 5, collected at the same station, but at different depths of the sediment.

Discussion

Microorganisms belonging to Gammaproteobacteria were dominant in the samples studied. This is not unexpected considering that bacteria from this phylogenetic group are among the most known and readily cultivable microorganisms from the marine environment (Fuhrman and Hagström 2008), and this result is in agreement with reports from other studies on diverse marine environments (Yanagibayashi et al. 1999; Kobayashi et al. 2008; Ettoumi et al. 2010; Finnegan et al. 2011). In the culture-independent study of Schauer et al. (2010) conducted at the Angola, Guinea and Cape Basins, Gammaproteobacteria was also the dominant group, although most of the phylotypes identified belonged to not yet cultivated species.

The only sample in which we could not detect Gammaproteobacteria was sample 5, collected at 70 cm below the surface of the sediment. This observation may be related to the fact that most of the marine bacteria from this phylogenetic group are aerobic or facultative anaerobic (Fuhrman and Hagström 2008), and their occurrence is favored on the surface of the

sediment, where oxygen is more abundant. We did not measure the oxygen concentration in the samples studied, but it is reasonable to presume that this element was absent in sample 5, considering the distribution of dissolved oxygen in marine sediments (Hensen et al. 2006).

Firmicutes was the second group most frequently isolated from the samples studied. This group and Actinobacteria comprise the Gram-positive bacteria. Recent studies have reported a greater presence of Gram-positive bacteria in marine sediments (Zhuang et al. 2003; Gontang et al. 2007; Sass et al. 2008), and in several cases these microorganisms are dominant among the cultivable bacteria (Toffin et al. 2004; Gärtner et al. 2011; Velmurugan et al. 2011). Most of the 27 strains identified in Firmicutes were related to endospore-forming bacteria (EFB, 19 strains), mainly *Bacillus*. The ability to produce endospores and the great metabolic and physiological diversity are two characteristics of the EFB that allow their distribution in all environments of our planet (Priest 1993), and this may explain the detection of these bacteria in all samples analyzed in our study. Some of the OTUs (25 identified as *Bacillus thuringiensis*, for instance) were identified as non-marine species of the EFB, and it is probable that these strains were latent in the sediments studied. However, other OTUs (27 and 28) were identified in the genus *Oceanobacillus*, which was originally described from deep-sea sediments (Lu et al. 2001). Therefore, some of the strains of EFB are probably true members of the communities of cultivable bacteria of deep-sea sediments.

The genus most frequently identified among the isolated strains was *Halomonas* (Gammaproteobacteria). This result was expected considering that this genus is widespread in the marine environment, and its cultivation has been

reported in several types of samples collected from deep-sea ecosystems, including sediments from hydrothermal vents, from abyssal plains and sub-surface, invertebrates and water, sometimes as dominant microorganisms (Xu et al. 2005; Kaye and Baross 2000; Kaye et al. 2004; Simon-Colin et al. 2008; Kaye et al. 2011). The widespread occurrence of *Halomonas* has been associated with its great physiological and metabolic versatility, which was demonstrated by their capability to assimilate a great variety of carbon sources, and by the growth of these bacteria in a wide range of salinities, temperatures and pressures (Okamoto 2004; Kaye and Baross 2004). These characteristics may not only explain the dominance of this genus, but also its occurrence in the samples studied. The metabolic versatility of *Halomonas* has also been associated with a great biotechnological potential, for production of enzymes and polyhydroxyalcanoates, for instance (Arahal and Ventosa 2006; Simon-Colin et al. 2008).

Psychrobacter and *Idiomarina* were the two other genera of Gammaproteobacteria more frequently identified among the strains. The detection of these genera in our samples is consistent with other studies. The genus *Idiomarina*, for instance, was originally described for strains isolated from deep-sea waters (Ivanova et al. 2000), and lately, another species has been described from a submarine volcano nearby the Hawaii Islands, and was named *Idiomarina loihiensis* (Donachie et al. 2003). Other investigators also reported the occurrence of *Psychrobacter* in deep-sea environments (Maruyama et al. 2000; Xu et al. 2005). Therefore, bacteria from these two genera may be considered native members of deep-sea communities.

Fifteen percent of the strains were isolated from the MA plates, without supplementation with CMC or Tween 40. The incorporation of CMC or Tween 40 in the culture media could have favored the growth of few organisms especially adapted to the utilization of these carbon sources or adapted to a higher concentration of carbon. These organisms may have inhibited the growth of other species, a phenomenon reported especially in Gammaproteobacteria (Gärtner et al. 2011), the dominant group among our strains. This hypothesis may explain the lower number of strains isolated from MA+CMC and MA+Tween40 plates.

The highest numbers of OTUs were detected in samples 1, collected at the Cape Abyssal Plain, and 6, collected at the Angola Abyssal Plain. Both samples also had the highest number of unique OTUs. These observations may be associated with local enrichments of the sediments with organic matter and nutrients in general, which are associated with the import of primary production from the overlying waters (Orcutt et al. 2011) and this region is characterized by a higher annual primary production (Gregg et al. 2003) in comparison to more tropical or central areas, resulting in a greater exportation of carbon to the sediments. This enrichment may result in a higher diversity of cultivable bacteria since these microorganisms, which are typically adapted to environments richer in organic matter in comparison to non-cultivable species (Fuhrman and Hagström 2008), may become dominant members of the community.

According to Schauer et al. (2010), the Walvis Ridge forms a barrier between the Cape Abyssal Plain and Angola Abyssal Plain, limiting the northward and southward flow of water at depths greater than 3000 m. Although these authors did not detect any influence of the Walvis Ridge on microbial

dispersal, they reported differences between the bacterial communities of the Angola and Cape Abyssal Plains. In our cluster analysis, the two samples originating from the Angola Basin grouped separately from most of the samples collected at the Cape Basin, forming two groups (group 1 and 2) with samples 7 from the Equatorial Region and 3 from the Cape Abyssal Plain, respectively. These differences may reflect different water masses or other environmental factors that occur north and south of the Walvis Ridge. To confirm and further elucidate these differences, we need to analyze a greater number of samples from both regions.

As already mentioned, sixteen OTUs could represent new species, considering a limit of similarity of 97% in the 16S rRNA gene sequences. However, this number could be even higher if we consider a limit of 98.5 to 99%, as revised and proposed by Stackebrandt and Ebers (2006). Concerning the methodologies adopted in this study, we did not employ special conditions of cultivation, such elevated hydrostatic pressures and low temperatures, similar to that existing at the origin of the samples. Therefore, we can say that other new microorganisms can be cultured from the source of the sediment samples. We also believe that a high number of strains would allow testing hypothesis related to the distribution of the different species identified.

Conclusions

The results of the present study demonstrated that a great part of the cultivable bacterial diversity of deep-sea environments is still unknown, and the implementation of new studies with this fraction of the microbial communities is justified. This is reinforced by the enormous biotechnological potential of these

microorganisms, already demonstrated in studies by other authors (Arahal and Ventosa 2006; Simon-Colin et al. 2008; Pettit 2011). In future studies, efforts should be directed to emulate the prevailing conditions at the deep-sea floor, and to isolate a higher number of strains.

Methods

Sampling

The samples studied were collected during a cruise carried out between 10/25/2009 and 11/29/2009 with the vessel Akademik Loffe (Academy of Sciences – Russia). A total of eight samples of deep-sea sediments (50g) were collected (Table 3 and Figure 4). Samples 4 and 5 were originated from the same sampling station, but from different depths in the sediment (top 10cm layer and 70cm below the surface). All the remaining samples were collected at the surface of the sediments. Samples were collected with trawls (samples 1, 5, 7 and 8) or push-core samplers (samples 2 and 4), aseptically transferred to sterile 15-ml Falcon tubes on board and kept at 4⁰C until processing, a month after collection. The in-situ temperature was not measured at the time of sampling, but Schauer et al. (2010) mentions values between 1.14 and 2.1⁰C in the deep-water of the Cape and Guinea Abyssal Plains.

Isolation of microorganisms

For the isolation of microorganisms, samples were serially and decimally diluted from 10^{-1} to 10^{-5} with filtered sterile seawater as diluent. Plates of Marine Agar (MA), Marine Agar supplemented with Tween 40 (MA+Tween 40) and Marine Agar supplemented with 1% carboxymethylcellulose (MA+CMC) were inoculated with 100 μ l of the different dilutions, in triplicate, and incubated for three weeks at 10°C. This temperature was chosen since it supports the growth of a wider range of bacteria (psychrophiles and cold-tolerant mesophiles). After incubation, plates were examined and colonies of different morphology were selected and transferred to new agar plates several times, for their isolation and purification. Bacterial isolates were stored in MA slants at 4°C, where they were transferred to new agar slants every four months (Bowman 2001).

DNA extraction and 16S gene amplification

For DNA extraction, the microorganisms were cultivated in marine broth for 2 to 7 days at 15°C. The extraction was conducted with the Genomic DNA Extraction kit from Real Genomics, following the instructions of the manufacturer. The 16S rRNA gene was amplified using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The amplification was performed in a reaction volume of 35 μ l with 3,5 μ l of 10X concentrated buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP mix, 0.1 μ M each primer, 2.5 U Taq polymerase and 20 to 40 ng template DNA. The PCR conditions were initial denaturation of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 55°C and 1 min at 72°C, and

a final extension at 72°C for 3 min. The reaction product was visualized on an agarose gel (1%) under UV light after ethidium bromide staining.

16S gene sequencing and analysis

The amplified PCR products of bacterial gene fragments (1465 nucleotides) were purified and sequenced at MACROGEN sequencing company, Seoul, Korea using the automated sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems) with BigDye Terminator Kit v. 3.1 (Applied Biosystems). Primers 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') and 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') were used for sequencing. The sequences obtained (515 to 1315 nucleotides) were edited with the software Vector NTI Suite 9, and compared with the NCBI database through BLAST searches. In this comparison, sequences of type strains most closely related to the sequences of the isolates were searched. For the definition of operational taxonomic units (OTUs), a similarity limit of 97% was adopted. The sequences were aligned with Muscle, and the trees were constructed from the evolutionary distances by the neighbor joining method with the software Mega (Tamura et al., 2011). The 16S rRNA gene sequences obtained in this study have been deposited in the NCBI GenBank under accession numbers JX860193 to JX860262.

Comparison of samples according to operational taxonomic units (OTUs)

The samples were compared according to the presence or absence of the different OTUs by cluster analysis. Accordingly, a dendrogram representation was generated using the Jaccard coefficient of similarity and the unweighted pair-wise grouping with mathematical averages (UPGMA) linkage method. This analysis was conducted with the Multi-Variate Statistical Package (MVSP) software (Kovach Computing Services).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' Contributions

MACS carried out the isolation and identification of the strains, the analysis of molecular data and drafted the manuscript; AC carried out the molecular analysis of part of the stains; AS, DCR and RBJ carried out the isolation of bacteria; MCQ, MLB and AP-K carried out the identification of part of the strains; GC participated in the design and coordination of the study, and help to draft the manuscript. AOSL participated in the design and coordination of the study, and help to align sequences and draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank the captain, the crew of the R/V Akademik Loffe and the Academy of Sciences, Russia, for the support during the cruise. We are grateful for Dr. José Angel Alvarez Perez coordinator of the project “Patterns and Processes of the Ecosystems of the Southern Mid-Atlantic” – Census of Marine Life (CoML), for the support to the cruise and to Dr André Silva Barreto for the collection of the samples. We also acknowledge the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Process 577915/2008-8) for financial support.

References

- Arahal DR, Ventosa A (2006) The Family Halomonadaceae. In: Dworkin M, Schleifer KH, Stackebrandt (ed) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, Springer-Verlag, New York
- Bowman JP (2001) Methods for psychrophilic bacteria. *Method Microbiol* 30:591-614
- Donachie SP, Hou S, Gregory TS, Malahoff A, Alam M (2003) *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic gamma-Proteobacterium from the Lō'ihi submarine volcano, Hawai'i. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1873–1879
- Elliott GM, Berndt C, Parson LM (2009) The SW African volcanic rifted margin and the initiation of the Walvis Ridge, South Atlantic. *Mar Geophys Res* 30:207–214
- Ettoumia B, Bouhajjaa E, Borinb S, Daffonchiob D, Boudabousa A, Cherif A (2010) Gammaproteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea

sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches. *Syst Appl Microbiol* 33:222–231

Finnegan L, Garcia-Melgares M, Gmerek T, Huddleston WR, Palmer A, Robertson A, Shapiro S, Unkles SE (2011) A survey of culturable aerobic and anaerobic marine bacteria in de novo biofilm formation on natural substrates in St. Andrews Bay, Scotland. *Antonie Leeuwenhoek* 100:399–404

Fuhrman JA, Hagström A (2008) Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In: Kirchman DL (ed) *Microbial ecology of the oceans*. 2nd edn. Wiley-Liss, New York

Gärtner A, Blümel M, Wiese J, Imhoff JF (2011) Isolation and characterization of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Antonie Leeuwenhoek* 100:421-435

Gontang EA, Fenical W, Jensen PR (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 73:3272–3282,

Gregg WW, Conkright ME, Ginoux P, O'reilly JE, Casey NW (2003) Ocean primary production and climate: global decadal changes. *Geophysical Research Letters*, doi:10.1029/2003GL016889

Hekinian R (1974) Petrology of the Ninety East Ridge (Indian Ocean) compared to other aseismic ridges. *Contr Mineral Petrol* 43:125-147

Hensen C, Zabel M, Schulz HD (2006) Benthic cycling of oxygen, nitrogen and phosphorus. In: Schulz HD, Zabel M. (eds) *Marine Geochemistry*. Springer, New York

Ivanova EP, Romanenko LA, Chun J, Matte MH, Matte GR, Mikhailov VV, Svetashev VI, Huq A, Mangel T, Colwell RR (2000) *Idiomarina* gen. nov.,

comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50:901–907

Jansen JHE, Van Weering TCE, Gieles R, Van Iperen J (1984) Middle and late quaternary oceanography and climatology of the Zaire-Congo fan and the adjacent eastern Angola Basin. Neth J Sea Res 17:201-249

Jorgensen BB, Boetius A (2007) Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. Nat Rev Microbiol 5:770-781

Kaye JZ, Baross JA (2000) High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. FEMS Microbiol Ecol 32:249-260

Kaye JZ, Baross JA (2004) Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure, and salinity on growth, phospholipid profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments. Appl Environ Microbiol 70:6220–6229

Kaye JZ, Márquez MC, Ventosa A, Baross JA (2004) *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. Int J Syst Evol Microbiol 54:499–511

Kaye JZ, Sylvan JB, Edwards KJ, Baross JA (2011) *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, subseafloor and deep-sea environments. FEMS Microbiol Ecol 75:123–133

Kobayashi T, Koide O, Mori K, Shimamura S, Matsuura T, Miura T, Takaki Y, Morono Y, Nunoura T, Imachi H, Inagaki F, Takai K, Horikoshi K (2008) Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic

microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles* 12:519–527

Levin LA, Gooday AJ (2003) The deep Atlantic Ocean. In: Tyler PA. (ed) *Ecosystems of the Deep Oceans*. Elsevier, Amsterdam, p. 39-79

Lu J, Nogi Y, Takami H (2001) *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* 205:291-297

Maruyama A, Honda D, Yamamoto H, Kitamura K, Higashihara T (2000) Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:835–846

Okamoto T, Maruyama A, Imura S, Takeyama H, Naganuma T (2004) Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, gyrB and ectBC gene sequences. *Syst Appl Microbiol* 27:323–333

Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, Edwards KJ (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(2):361-422

Pettit RK (2011) Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. *Mar Biotechnol* 13:1–11

Polymenakou PN, Lampadariou N, Mandalakis M, Tselepides A (2009) Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol* 32:17–26

Priest FG (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Losick R. (ed) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. AMS Press, Washington

Salters VJM, Sachi-Kocher A (2010) An ancient metasomatic source for the Walvis Ridge basalts. *Chem Geol* 273:151–167

Sass AM, Mckew BA, Sass H, Fichtel J, Timmis KN, Mcgenity TJ (2008) Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Syst* 4:8-18

Schauer R, Bienhold C, Ramette A, Harder J (2010) Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *ISME J* 4:159–170

Simon-Colin C, Raguénès G, Cozien J, Guezennec JG (2008) *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *J Appl Microbiol* 104:1425–1432

Smith CR, Leo FC, Bernardino AF, Sweetman AK, Arbizu PM (2008) Abyssal food limitation, ecosystem structure and climate change. *Trends Ecol Evol* 23:518-528

Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33:152-155

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. *Method Molecul Biol Evol* 28: 2731-2739.

- Toffin L, Webster G, Weightman AJ, Fry JC, Prieur D (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol Ecol* 48:357–367
- Velmurugana N, Kalpanaa D, Chob JY, Leec GH, Parkc SH, Leea YS (2011) Phylogenetic analysis of culturable marine bacteria in sediments from South Korean Yellow Sea. *Microbiol* 80:261–272
- Xu M, Wang P, Wang F, Xiao X (2005) Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province. *Biodivers Conserv* 14:3363-3380
- Yanagibayashi M, Nogi Y, Li L, Katoc (1999) Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiol Lett* 170:271-279
- Zeng X, Xiao X, Wang P, Wang F (2004) Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(5): 952-958
- Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *P Natl Acad Sci USA* 99:15681–15686
- Zhuang W-Q, Tay J-H, Maszenan AM, Krumholz LR, Tay ST-L (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 36:251–257



Figure 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Gammaproteobacteria strains.

Legend: Bootstrap support values over 70% are shown. The scale bar indicates evolutionary distance.

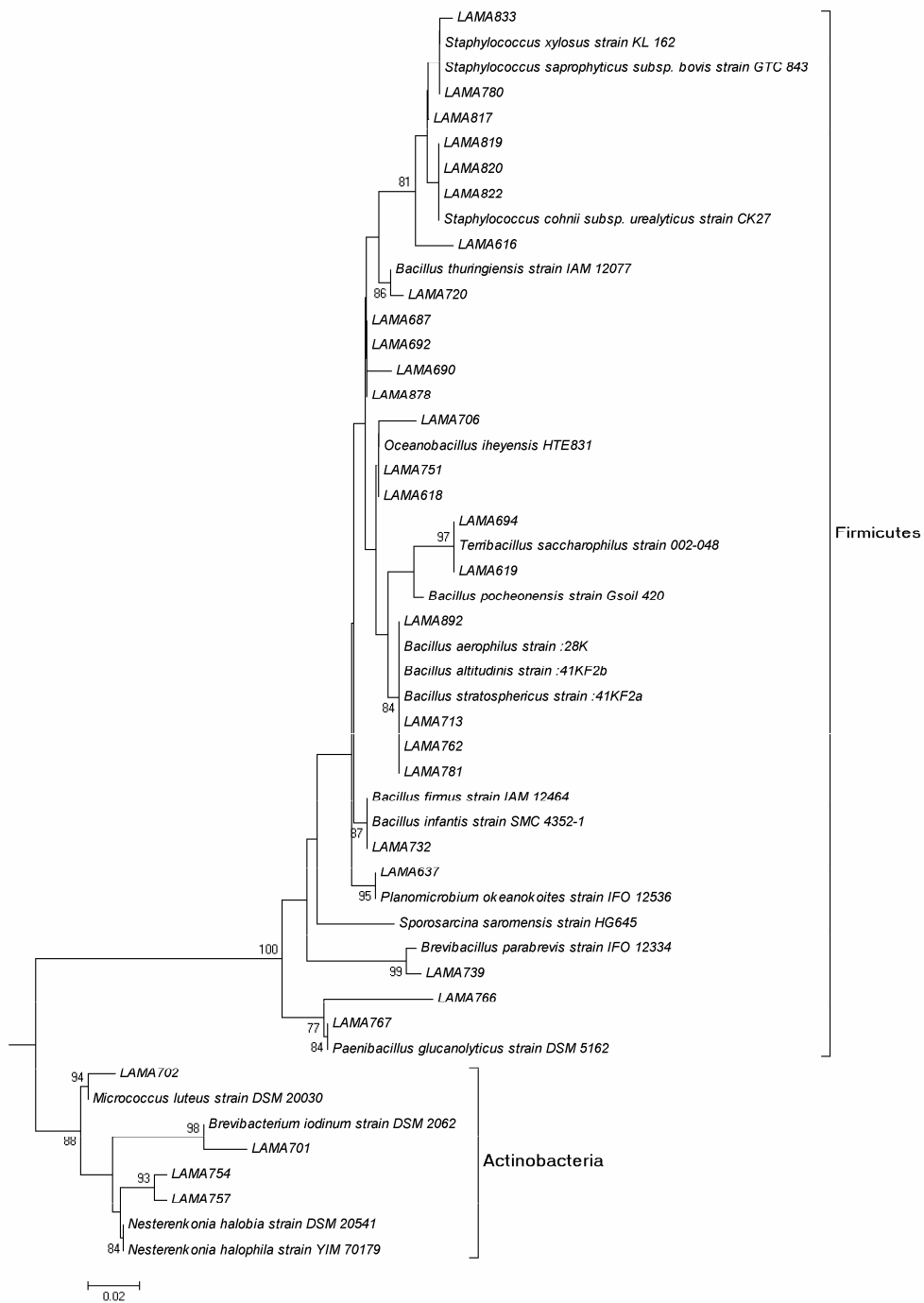


Figure 2. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Firmicutes/Actinobacteria strains.

Legend: Bootstrap support values over 70% are shown. The scale bar indicates evolutionary distance.

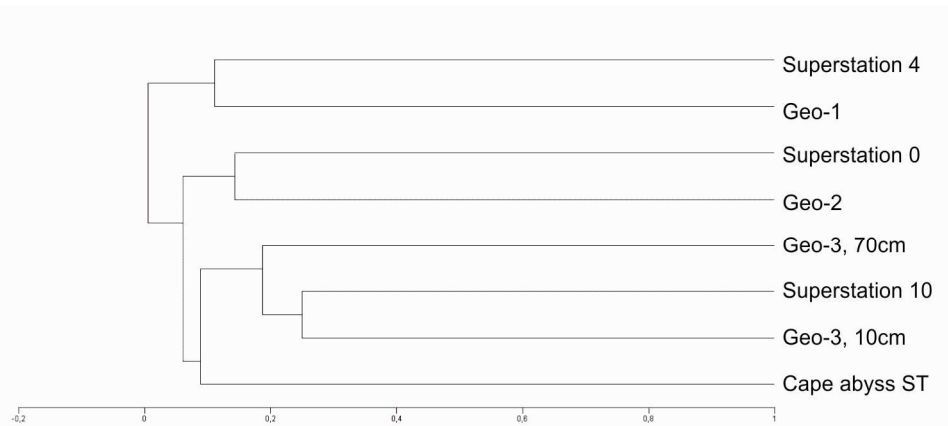


Figure 3. Dendrogram showing the similarity of the samples, accordingly to the presence/absence of the established OTUs.

Legend: Similarities were calculated using the Jaccard coefficient and UPGMA linkage. Group 1 compromise samples 2 and 7, group 2, samples 3 and 6, and group 3 samples 1, 4, 5 and 8.

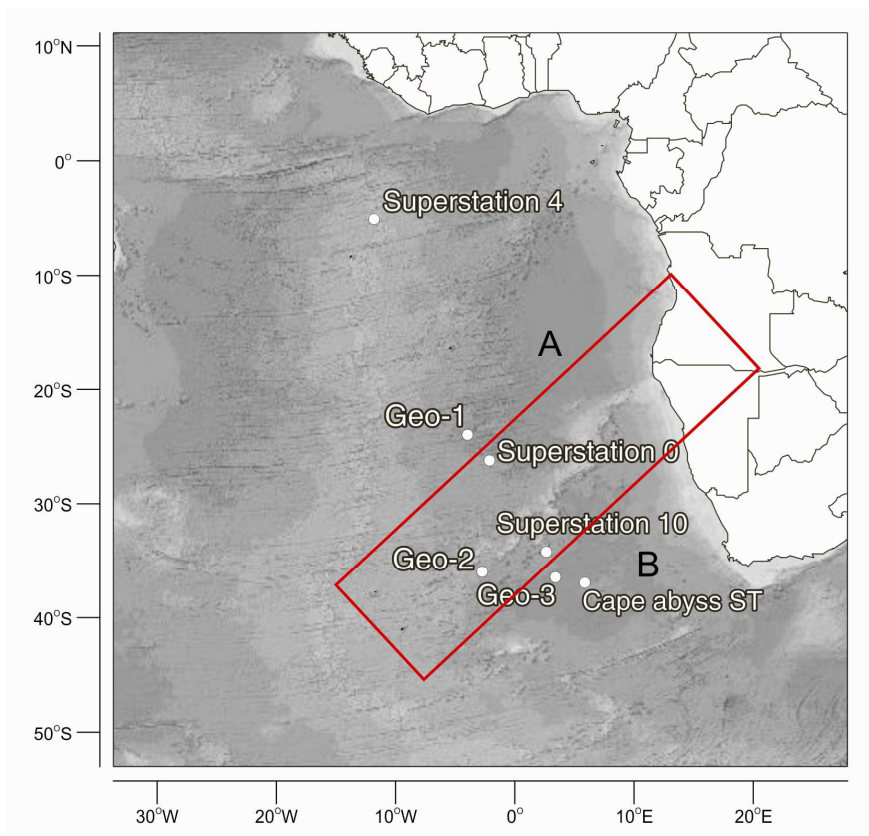


Figure 4. Localization of the sampling stations.

Legend: The Walvis Ridge is highlighted in red. A, Angola Abyssal Plain; B, Cape Abyssal Plain.

Table 1. Colony counts (MA plates) and number of strains obtained from the three culture media employed.

Sample	Number of Isolates	CFU/g
1	15	1410000
2	5	1172500
3	10	1533
4	7	467
5	4	43111
6	10	193333
7	6	23
8	13	27

Table 2. Numbers of each OTU identified in more than one sample analyzed.

OTUs (number and description)	Sample							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1, <i>Cobetia marina</i> strain DSM 4741						1	1	
7, <i>Halomonas boliviensis</i> strain LC1			4	1		1		4
9, <i>Halomonas sulfidaeris</i> strain Esulfide1			1			1		1
13, <i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2-TR	5					1		
21, <i>Bacillus firmus</i> strain IAM 12464				1				4
23, <i>Bacillus pocheonensis</i> strain Gsoil 420	1			1	1			1
27, <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	1			1				
31, <i>Planomicrobium okeanokoites</i> strain IFO 12536		1					1	
37, <i>Terribacillus saccharophilus</i> strain 002-048					3			1

Table 3. Localization and depths of sediment samples studied.

Sample	Station	Latitude	Longitude	Depth (m)	Region	Sampler
1	Cape abyss ST	36°21'22'S	05°52'09'E	1107	CAP	Trawls
2	Geo-1	23°30'52'S	04°17'19'W	5000	AAP	Push-core
3	Geo-2	35°20'00'S	03°01'00'W	5083	CAP	Push-core
4	Geo-3, 10cm	35°50'18'S	03°26'38'E	5200	CAP	Push-core
5	Geo-3, 70cm	35°50'18'S	03°26'38'E	5200	CAP	Trawls
6	Superstation 0	25°41'70'S	02°20'72'W	4640	RT	Push-core
7	Superstation 4	04°40'22'S	12°16'20'W	1900	SEMS	Trawls
8	Superstation 10	33°40'17'S	02°35'12'E	4400	WRS	Trawls

Legend: CAP, Cape Abyssal Plain; AAP, Angola Abyssal Plain; SEMS, South Equatorial Region; WRS, Walvis Ridge Region.

Additional file 1. Identification, similarity percentage and strains in each operational taxonomic unit identified in the present study.

OTU	Next related type strains	Acession number	Identity	Strain
<i>Gammaproteobacteria</i>				
1	<i>Cobetia marina</i> strain DSM 4741	NR_042065.1	98 - 99%	LAMA 622 & LAMA 625
2	<i>Halomonas aquamarina</i> strain DSM 30161/ <i>Halomonas axialensis</i> strain Althf1/ <i>Halomonas meridiana</i> strain DSM 5425	NR_042063.1/NR_027219.1/NR_042066.1	98%	LAMA 704
3	<i>Halomonas boliviensis</i> strain LC1	NR_029080.1	93%	LAMA 796
4	<i>H. boliviensis</i> strain LC1	NR_029080.1	94%	LAMA 642
5	<i>H. boliviensis</i> strain LC1/ <i>H. neptunia</i> strain Eplume1	NR_029080.1/NR_027218.1	99%	LAMA 791, LAMA 809 & LAMA 879
6	<i>H. boliviensis</i> strain LC1	NR_029080.1	96%	LAMA 837
7	<i>H. boliviensis</i> strain LC1	NR_029080.1	97 - 99%	LAMA 627, LAMA 643, LAMA 644, LAMA 646, LAMA 734, LAMA 794, LAMA 797, LAMA 802, LAMA 807 & LAMA 810
8	<i>H. boliviensis</i> strain LC1/ <i>Halomonas neptunia</i> strain Eplume1	NR_029080.1/NR_027218.1	95%	LAMA 645
9	<i>H. sulfidaeris</i> strain Esulfide1	NR_027185.1	94%	LAMA 634
10	<i>H. sulfidaeris</i> strain Esulfide1	NR_027185.1	96%	LAMA 638
11	<i>H. sulfidaeris</i> strain Esulfide1	NR_027185.1	98 - 99%	LAMA 632, LAMA 633, LAMA 636, LAMA 770, LAMA 786 & LAMA 838
12	<i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2-TR	NR_025119.1	93%	LAMA 617
13	<i>I. loihiensis</i> strain L2-TR	NR_025119.1	96%	LAMA 683
14	<i>I. loihiensis</i> strain L2-TR	NR_025119.1	99 - 100%	LAMA 691

Additional file 1 (continued)

OTU	Next related type strains	Acession number	Identity	Strain
15	<i>Marinobacter excellens</i> strain KMM 3809	NR_025690.1	99%	LAMA 842
16	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> strain KMM 3549/ <i>Pseudoalteromonas tetraodontis</i> strain IAM 14160	NR_025139.1/NR_041787.1	99%	LAMA 784
17	<i>Psychrobacter aquaticus</i> strain CMS 56/ <i>Psychrobacter vallis</i> strain : CMS 39	NR_042206.1/NR_042205.1	96%	LAMA 624
18	<i>Psychrobacter namhaensis</i> strain SW-242	NR_043141.1	96%	LAMA 723
19	<i>Psychrobacter nivimaris</i> strain 88/2-7	NR_028948.1	98 - 99%	LAMA 639, LAMA 641, LAMA 799 & LAMA 818
<i>Firmicutes</i>				
20	<i>Bacillus aerophilus</i> strain :28K/ <i>B. altitudinis</i> strain :41KF2b/ <i>B. stratosphericus</i> strain :41KF2a	NR_042339.1/NR_042337.1/NR_042336.1	99%	LAMA 713, LAMA 762, LAMA 781 & LAMA 892
21	<i>Bacillus firmus</i> strain IAM 12464	NR_025842.1	94%	LAMA 692
22	<i>Bacillus infantis</i> strain SMC 4352-1	NR_043267.1	99%	LAMA 732
23	<i>Bacillus pocheonensis</i> strain Gsoil 420	NR_041377.1	93%	LAMA 690
24	<i>B. pocheonensis</i> strain Gsoil 420	NR_041377.1	97%	LAMA 687 & LAMA 878
25	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	NR_043403.1	99%	LAMA 720
26	<i>Brevibacillus parabrevis</i> strain IFO 12334	NR_040981.1	99%	LAMA 739
27	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	NR_028001.1	93%	LAMA 706
28	<i>O. iheyensis</i> HTE831	NR_028001.1	99%	LAMA 618 & LAMA 751
29	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> strain DSM 5162	NR_040883.1	96%	LAMA 766
30	<i>P. glucanolyticus</i> strain DSM 5162	NR_040883.1	99%	LAMA 767
31	<i>Planomicrobium okeanokoites</i> strain IFO 12536	NR_025864.1	97%	LAMA 637
32	<i>Sporosarcina saromensis</i> strain HG645	NR_041359.1	98%	LAMA 695
33	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain CK27	NR_037046.1	96%	LAMA 616

Additional file 1 (continued)

OTU	Next related type strains	Acession number	Identity	Strain
34	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain CK27	NR_037046.1	97 - 99%	LAMA 817, LAMA 819, LAMA 820 & LAMA 822
35	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> strain GTC 843	NR_041324.1	99%	LAMA 780
36	<i>Staphylococcus xylosus</i> strain KL 162	NR_036907.1	97%	LAMA 833
37	<i>Terribacillus saccharophilus</i> strain 002-048	NR_041356.1	99%	LAMA 619 & LAMA 694
<i>Actinobacteria</i>				
38	<i>Brevibacterium iodinum</i> strain DSM 2062	NR_026241.1	97%	LAMA 701
39	<i>Micrococcus luteus</i> strain DSM 20030	NR_037113.1	98%	LAMA 702
40	<i>Nesterenkonia halobia</i> strain DSM 20541	NR_026197.1	96%	LAMA 757
41	<i>Nesterenkonia halophila</i> strain YIM 70179/ <i>N. halobia</i> strain DSM 20541	NR_043205.1/NR_026197.1	97%	LAMA 754

3.2. Artigo 2: Phylogenetic Identification and Distribution of Cultivable Pelagic Bacteria from the Rio Grande Rise region, South Atlantic Ocean

Artigo a ser submetido a publicação

**PHYLOGENETIC IDENTIFICATION AND DISTRIBUTION OF CULTIVABLE
PELAGIC BACTERIA FROM THE RIO GRANDE RISE REGION, SOUTH
ATLANTIC OCEAN**

Marcus Adonai Castro da Silva¹; Maria Letícia Biavatti¹; Jurandir Pereira Filho¹;
Leonardo Rübi Rorig², Gertrudes Corção³; André Oliveira de Souza Lima¹.

¹*Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Itajaí-SC, Brazil.*

²*Departamento de Botânica – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Campus Trindade – Florianópolis – SC – Brazil
CEP: 88.040-970*

³*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Cidade Baixa, 90050-170 Porto Alegre-RS, Brazil.*

Corresponding author: Marcus Adonai Castro da Silva. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Itajaí-SC, Brazil. E-mail: marcus.silva@univali.br

ABSTRACT

Aiming to contribute to the knowledge of the microbiology of Rio Grande Rise, we conducted the cultivation of bacteria from samples collected at four stations and four different depths (surface, 50m, 200m and deep-water) at each station. The analysis of some chemical variables (nutrients, dissolved oxygen, salinity

and chlorophyll-a) was also conducted in the samples. Bacteria were isolated by the spread plate technique in diluted Marine Agar (1:5) plates and the association between the chemical variables and the bacterial groups was done by Principal Component Analysis. Sixty-eight bacteria were isolated and identified by partial sequencing of the 16s rRNA gene. Five bacterial classes were identified among the strains. Gammaproteobacteria was the most represented class, and seems to be associated with high salinity and nutrient-poor waters. Bacilli and Alphaproteobacteria were also well represented but did not show any particular association with the environmental variables studied. Flavobacteriia and Actinobacteria were the less frequent identified classes, and seemed to be associated with nutrient and dissolved oxygen-rich waters. The main genera identified among the strains were *Salinicola*, *Halomonas*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Erythrobacter* and *Pseudoalteromonas*. The Roseobacter clade was represented by only two strains of the genus *Sulfitobacter*, and two strains in the genus *Paracoccus* may represent new species.

Keywords: Cultivable bacteria; Rio Grande Rise; South Atlantic Ocean; Vertical distribution.

INTRODUCTION

After several years of cultivation-independent analysis of the microbial diversity, we have now a better picture of the composition of prokaryotic communities living in various marine environments, including sediments (POLYMENAKOU et al., 2009), pelagic waters (GIUDICE et al, 2012), sub seafloor (NUNOURA et al., 2009), hydrothermal vents (DICK; TEBO, 2010) and so on. Nevertheless,

most of these studies fail to link function to the organisms detected. The metatranscriptomic approach has been used recently to surpass this limitation (LÜCKERA et al., 2010), but the study of microbial cultures is until today the best way to comprehend the physiology of microorganisms and to gain a better understanding of its possible function in the marine ecosystems (GIOVANNONI; STINGL, 2007). Besides that, the field of biotechnology can obtain great benefits from collections of microorganisms isolated from marine samples, as several studies indicate the novelty of enzymes (LEE et al., 2010) and other molecules (PETTIT, 2011) produced by these biological machines.

Most of the marine cultivable bacteria fall into a few phylogenetic groups. Gammaproteobacteria appears to be the dominant class of cultivable bacteria, being found in practically every marine environment studied (RAFIDINARIVO et al., 2007; FINNEGAN et al. 2011). The genera most frequently identified of Gammaproteobacteria include *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio* and *Halomonas*. Alphaproteobacteria is also commonly cultivated from marine pelagic samples (NA et al., 2011), and includes the now well established “*Roseobacter*” clade, a group of cultivable bacteria which is atypically among the most abundant prokaryotes in pelagic waters (BRINKHOV et al., 2008). Bacteria of the class Flavobacteriia (Phylum Bacteroidetes) are sometimes also abundant in the plankton, being associated to phytoplankton blooms and with decomposition of complex molecules including DNA, proteins and macroalgae-derived polymers like agar and alginate (O’SULLIVAN et al., 2004). The Gram-positive groups (classes Bacilli and Actinobacteria) are sometimes detected in marine waters, but are usually more prominent in the sediments, where they

may become the dominant members of the cultivable community (GÄRTNER et al., 2011).

The Rio Grande Rise is a marine feature of the western South Atlantic Ocean, which separates the Brazil and the Argentine oceanic basins. It is localized between 28° – 33°S of latitude and 29° – 39°W of longitude, rising up to 3200m from the ocean floor (KUMAR, 1979). The Rio Grande Rise is generally described as a non-seismic ridge, originated from the late Cretaceous, but basalts from other periods were already recovered from this region (MOHRIAK, et al., 2010).

To our knowledge there are no studies conducted on the bacterial community of the Rio Grande Rise Region. So, to contribute to the understanding of the biological characteristics of this region of the South Atlantic, we conducted the isolation and phylogenetic identification of bacteria from the pelagic samples collected during a cruise that occurred in November of 2011.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

The samples studied were collected during a cruise between 11/08/2011 and 11/17/2011 with the Antares vessel. A total of sixteen samples of water were collected in four stations and different depths (Table 1 and Figure 1). Samples were collected with Ninski bottles, aseptically transferred to sterile Falcon tubes of 15ml on board and kept at 4°C until processing, after seven to twelve days of collection.

Chemical Analysis

Samples for chemical analysis were filtered (0,22 µm milipore filters) on board and kept frozen until processing. At the laboratory the samples were unfrozen and analyzed for nutrients (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} e SiO_2) by colorimetric methods accordingly to Strickland and Parsons (1972). The equipment employed was a Shimadzu UV 1800 spectrophotometer, with 10 cm (NO_2^- and PO_4^{3-}), 5 cm (SiO_2 , NH_4^+ and NO_3^-) and 1 cm (NO_3^-) cuvettes, depending on the concentration. For each nutrient a calibration curve was prepared from standard solutions. The dissolved oxygen and salinity were measured *in situ* by a Seabird CTD that included oxygen sensors.

Chlorophyll-a concentration was obtained by filtering 2 to 3 liters of seawater with GF/F filters. The pigments were extracted from filters with 10 ml of acetone 90% by 24 hours at -17°C in the dark and read in a Turner Designs Trilogy Fluorometer© as raw fluorescence of chlorophyll-a to get high sensitivity readings even in samples with very low levels of chlorophyll-a (Chlorophyll Non-Acidification kit Turner 7200-046). These values were converted to $\mu\text{g.L}^{-1}$ according to Parsons et al. (1989), after fluorometer calibration with pure chlorophyll-a 90% acetone extract ($\mu\text{g.L}^{-1}$ of chlorophyll-a = $F * R * v/V$; where R is the fluorometer reading, F is the calibration factor, v is the volume of acetone extract in ml and V is the volume of seawater in liters).

Isolation of microorganisms

For the isolation of microorganisms, samples were serially and decimally diluted from 10^{-1} to 10^{-2} with filtered sterile seawater as diluents. Then plates of diluted Marine Agar (MA), were inoculated with 100µl of the different dilutions and of the undiluted sample, in triplicate, and incubated for sixteen days at 15°C . After

incubation, plates were examined and colonies of different morphologies were selected and transferred to new agar plates several times, until its isolation and purification. Bacteria isolates were stored in MA slants at 4⁰C, being transferred to new agar slants every four months (BOWMAN, 2001).

DNA extraction and 16S gene amplification

For DNA extraction, the microorganisms were cultivated in marine broth for 2 days at 30°C. The extraction was conducted with the Genomic DNA Extraction kit from Real Genomics, following the instructions of the manufacturer. The 16S rRNA gene was partially amplified using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'). The amplification was performed in a reaction volume of 35 µl with 3.5 µl of 10X concentrated buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix, 0.1 µM each primer, 2.5 U Taq polymerase and 20 to 40 ng template DNA. The PCR conditions were initial denaturation of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 55°C and 1 min at 72°C, and a final extension at 72°C for 3 min. The reaction product was visualized on an agarose gel (1%) under UV light after ethidium bromide staining.

16S gene sequencing and analysis

The amplified PCR products of bacterial gene fragments were purified and sequenced at MACROGEN sequencing company, Seoul, Korea using the automated sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems) with BigDye Terminator Kit v. 3.1 (Applied Biosystems). Primers 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') and 1492R

(5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') were used for sequencing. The sequences obtained (423 to 1392 nucleotides) were edited with the software Vector NTI Suite 9, and compared with the NCBI database through BLAST searches. In this comparison, sequences of type strains most closely related to the sequences of the isolates were searched. For the definition of operational taxonomic units (OTUs), a similarity limit of 97% was adopted. The sequences were aligned with Muscle, and the trees were constructed from the evolutionary distances by the neighbor joining method with the software Mega5 (Tamura et al., 2011). The 16S rRNA gene sequences obtained in this study has been deposited in the NCBI GenBank under accession numbers KC583186 to KC583253.

Data analysis

The association of the chemical variables with the frequencies of the bacterial classes identified was studied by Principal Component Analysis. This analysis was conducted with the Multi-Variate Statistical Package (MVSP) software (Kovach Computing Services).

RESULTS

Overview of the Microbiological and Chemical Characteristics of the Samples

Colony-forming units per milliliter varied between 0 (station 6, 200m) and 2500 (station 6, 50m) in the samples (Figure 2). In station 4 was observed an increased in the CFU/ml with depth, with values remaining constant below 200m. In stations 6 and 14 CFU/ml peaked at 50m, while at station 11 there was a decreased of CFU/ml with depth. Chlorophyll-a peaked at 50-100 m at all

stations, and decreased sharply below the 200 m (Figure 3). This variable was not analysed for samples collected at station 4. The concentrations of NO_3^- , PO_4^+ and Si followed the classic vertical profile of nutrients, with low concentrations at the photic zone, which increased below 200m. NO_2^- and NH_4^+ concentrations were higher at the surface layer, decreasing in waters below 500m (Figures 4-7). The salinity was constant, with values slightly higher in surface waters. The concentration of dissolved oxygen was higher below the surface, decreased with depth, and then rise again in deep-waters, but the magnitude of variation was also small. As expected, the temperature decreased with depth reaching 2,5°C below 1500 m. A thermocline was present around 50m depth in all stations.

Class-level Diversity of the Cultivable Bacteria and Association with the Environmental Variables

Sixty-eight microorganisms were isolated from the sixteen samples studied. These microorganisms belonged to five bacterial classes, Gammaproteobacteria (n = 32), Bacilli (n = 14), Alphaproteobacteria (n = 11), Flavobacteriia (n = 8) and Actinobacteria (n = 3) (Figure 8 and 9). The classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Bacilli were isolated from all stations, Flavobacteriia was not detected in station 11 and Actinobacteria was not detected in stations 6 and 11 (Figure 10). Concerning the different depths sampled, the classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Bacilli were detected in all depths, Actinobacteria was only isolated from surface samples, while Flavobacteriia were isolated from the depths below 50 meters.

An analysis by PCA was conducted to evaluate the association between the frequencies of the different bacterial classes and the environmental variables studied (Figure 11). It was observed an association of Actinobacteria and Flavobacteriia with waters richer in chlorophyll-a, nutrients and dissolved oxygen. Gammaproteobacteria was associated with waters with higher salinity, and an opposite relationship to nutrient-rich waters. Bacilli and Alphaproteobacteria does not seem to be associated with the other bacterial classes or the variables studied, except for silica. The two extracted axis explain 75% of the data.

Phylogenetic Analysis of Each Class

Thirty-four OTUs were identified among the 68 strains (Table 2). Gammaproteobacteria was represented by eleven OTUs, belonging to eight genera. The OTU related to *Salinicola salarius* had the higher number of strains (n = 6), and was isolated mainly from surface waters, from stations 6 and 11. Two OTUs were related to the genus *Halomonas*, and they were detected at all stations, in different depths. The genus *Alteromonas* was represented by two OTUs, related to the species *Alteromonas macleodii* (n = 5) and *Alteromonas marina* (n = 2), that were isolated from the same location (station 14), at different depths, excluding surface waters. Two OTUs were also identified in the genus *Idiomarina* (n = 3) and these were isolated from surface and deep-waters (1500m). The remaining genera were represented by only one OTU and one strain, with the exception of the OUT related the species *Pseudoalteromonas mariniglutinoso*, which included four strains isolated from stations 11 and 14.

Eight OTUs were identified in the class Alphaproteobacteria. The genus *Paracoccus* included three OTUs. Two of these may represent new species, since they showed less than 97% of similarity with described species. Two OTUs were identified in the genus *Erythrobacter*, and were closely related to the species *Erythrobacter citreus* (n = 3) and *Erythrobacter flavus* (n = 2). *Erythrobacter* was the most frequent identified genus of Alphaproteobacteria, and was isolated from different depths and stations. Two OTUs belonging to the *Roseobacter* clade were identified, both represented by only one strain, related to the genus *Sulfitobacter*. These strains were isolated from two different stations and depths. The last OTU was related to the species *Henriciella marina*.

The class Bacilli was also represented by eight OTUs, six related to the genus *Bacillus* and two to the genus *Staphylococcus*. One OTU was related to the species *Bacillus stratosphericus*, and was represented by five strains, all originated from the same sample (station 6, 50m). Two OTUs were related to the species *Bacillus patagoniensis* and *Bacillus lehensis*, and included two strains each. These microorganisms were only isolated from deep-waters. The remaining OTUs were represented by only one strain in each case.

Flavobacteriia includes four OTUs, each related to a different genus. The OTU related to the species *Zunongwangia profunda* included three strains, and was only isolated from the deep-waters (200 and 1500m) of station 4. Both strains of *Joostella marina* were isolated from the sample collected at 200m at station 4, while both strains of the OTU related to *Krokinobacter genikus* were isolated from the sample collected at 50m, at station 14. The last OTU of Flavobacteriia was represented by only one strain, isolated from station 6 at 50 m, and was related to the species *Leeuwenhoekiella blandensis*. Finally, the class

Actinobacteria was represented by three OTUs, from different genera, and each including only one strain, all isolated from surface waters.

DISCUSSION

In this study bacteria cultivated on Diluted Marine Agar (1:5) were counted and identified phylogenetically. The increased of CFU with depth, observed in Station 4 could be related to the higher concentrations of inorganic nutrients observed at deep waters. This is reasonable since bacteria may compete with primary producers for the available nitrogen, phosphorus and other nutrients at photic zone. Besides, bacteria at the photic zone may be subjected to inhibitory effects of light, especially of the ultraviolet wave lengths (KIRCHMAN, 2008). In Stations 6 and 14 there was a peak of CFU at 50m, which coincide with the peak of chlorophyll-a and with the thermocline. Besides, at station 11 CFU was higher at the surface, which was also rich in chlorophyll-a. This indicates that cultivable bacteria are favored by the organic matter produced by phytoplankton, especially at the thermocline. This is in agreement of previous observations on the vertical distribution of cultivable bacteria in oceanic waters (RHEINHEIMER, 1987).

In this study we identified an association of the classes Actinobacteria and Flavobacteriia with waters richer in nutrients, chlorophyll-a and oxygen. This observation is in agreement with what is known about the physiology of these microorganisms. They are strict aerobes that are associated with the decomposition of complex organic matter. In this process they may be tightly coupled to the primary producers (O'SULLIVAN et al., 2004) or to suspended

organic aggregates (BULL et al., 2005), in the degradation of polymers like proteins, nucleotides and carbohydrates, and this could result in the regeneration of nutrients like ammonium and phosphate (QIN et al., 2010).

Gammaproteobacteria, in our analysis, was more associated to surface waters, which are more oligotrophic and has a higher salinity due to evaporation. This observation is in agreement with other studies (CHO et al., 2007), although these bacteria can be found at all depths, as was also reported by other researchers (MA et al., 2009). The success of an organism in thriving in the oligotrophic waters of the photic zone may be related to various physiological strategies. In dealing with the scarcity of nutrients, bacteria may use transport systems with a higher affinity for the molecule (AMIM et al., 2012), or it may reduce its size to optimize the nutrient absorption by a higher surface to volume relationship (ABDALLAH et al., 2011). These two strategies were described in marine Gammaproteobacteria, as was demonstrated the ability to produce proteorhodopsins, which are light-driven proteins that create proton-motive force which can be used to produce additional energy to sustain metabolism in nutrient-depleted conditions (STINGL et al., 2007). These observations may explain the lack of association of Gammaproteobacteria to nutrient rich waters observed in the present study.

The classes Bacilli and Alphaproteobacteria did not show any particular association with the environmental variables studied or the other classes. This may indicate that these groups might be distributed equally in the pelagic realm. This distribution could be a function of the physiological versatility of these bacterial groups. Alphaproteobacteria, for instance, comprises marine bacteria that are capable of heterotrophic metabolism, sulphur oxidation, and even

aerobic anoxygenic phototrophy, as in the case for members of the “*Roseobacter*” clade (BRINKHOV et al., 2008) and the genus *Erythrobacter* (KOBÍZEK et al., 2003), which were both detected among our strains. In the case of the class Bacilli, the widespread distribution in the water column may also be associated with the production of endospores by members of the genus *Bacillus*, the most frequent identified genus among our strains. The endospores not only enhance survival, but also facilitate the dispersion of the microorganisms (PRIEST, 1993), which could explain the occurrence of Bacilli through the entire pelagic realm.

The OTUs identified in the class Gammaproteobacteria included genera usually associated with oceanic habitats. *Halomonas*, for instance, is one of the most frequent genera isolated from samples below the photic zone (ORCUTT et al., 2011). The genera *Idiomarina* was originally described for strains from deep-seawaters of the north-western Pacific Ocean (IVANOVA et al., 2000), and is not unexpected that our strains were also isolated from deep-water as well.

Alteromonas, especially the species *A. macleodii*, seems to be widespread on the water column, although it may include different ecotypes associated with surface and deep-waters (IVARS-MARTINEZ et al., 2008). It is also commonly detected in metagenomic libraries (SMEDILE et al., 2013), and accordingly to these observations, *A. macleodii* was, in this study, one of the species with a higher number of strains, that were isolated from different depths in the water column. *Pseudoalteromonas* is a bacterial genus normally associated with other organisms and with the production of biologically active molecules, but it is also widespread in the marine environment (SKOVHUS et al., 2007). Therefore, the identification of *Pseudoalteromonas* among our strains was not unexpected.

Salinicola salarius was the species with a higher number of strains in our collection. This species was originally described from seawater samples collected in Korea (KIM et al., 2007), and it has been poorly studied since then. We could not find any other report of this organism from the marine environment, but it is reasonable to find *S. salarius* among our strains, considering its original isolation.

The class Alphaproteobacteria included two possibly new species in the genus *Paracoccus*. In the last years several new species of the genus have been described from the marine environment, including tidal flat sediments (ROH et al., 2009), coastal (KHAN et al., 2008) and oceanic seawater (FU et al., 2011). Despite of this, the isolation of these new strains indicates that many more marine species remain to be described in the genus *Paracoccus*.

Erythrobacter was the best represented genus of Alphaproteobacteria among our strains. These bacteria are frequently isolated from oceanic waters, usually from the photic zone and includes strains containing bacteriochlorophyll-a, and capable of aerobic anoxygenic phototrophy (KOBÍZEK et al., 2003). Our strains were isolated from different depths, in agreement with Rathgeber et al. (2008), who also reported the distribution of these bacteria through the entire water column. Finally, the clade “*Roseobacter*” was represented by two OTUs related to the genus *Sulfitobacter*. This group of organisms is among the dominant bacteria in the marine plankton and this was reported for *Sulfitobacter* in sub-antarctic seawater (PRABAGARAN et al., 2007). Although this was not the case in our samples, our results are in agreement with the general occurrence of *Sulfitobacter* in seawater, in which it is associated with the cycling of organic sulfur (IVANOVA et al. 2004).

The OTUs identified in the class Bacilli included species not typically marine. The species *B. patagoniensis* and *B. lehensis*, for instance, were isolated from soil samples (OLIVEIRA et al., 2005; GHOSH et al., 2007), and we could not find any other report of these bacteria from the marine environment. The species *B. stratosphericus*, was originally isolated from air samples (SHIVAJI et al., 2006), but was previously reported from estuarine (ZHANG et al., 2012) and deep-sea sediments (SILVA et al., 2013), but, as with the other strains, they may originate from non-marine sources and persist as endospores in the oceanic environment. The presence of other species such as *Staphylococcus cohnii* (KLOOS; WOLFSHOHL, 1991) and *Staphylococcus saprophyticus* (KIM et al., 2012), which are associated with humans, and *Bacillus anthracis*, which is a soil bacterium that may also cause disease in humans (KOEHLER, 2009), confirms that most of the OTUs belonging to the class Bacilli may originate from non-marine sources, and even may be contaminants in the samples collected.

The distribution of the OTUs included in the class Flavobacteriia is in agreement with the earlier descriptions of these organisms. *J. marina*, for instance, was originally isolated from more shallow waters (100m, QUAN et al., 2008) then *Z. profunda*, which was originally described from the deep-sea (QIN et al., 2007). Besides that, two of the species that were studied in more detail, *Z. profunda* and *L. blandensis*, show physiologies that are in agreement with the association of the class Flavobacteriia with nutrients and oxygen, as described in this study (PINHASSI et al., 2006; QIN et al., 2010).

Finally, it was suggested that many of the Actinobacteria reported in the marine environment are from terrestrial sources, as stated for the class Bacilli (WARD; BORA, 2006). It seems that this is not the case with our strains of

Actinobacteria, considering the frequent reports from the marine environment of the species identified in our study (SFANOS et al., 2005; D'ONOFRIO et al., 2010). One of the species, *Kytococcus sedentarius*, was even originally described from marine sources (SIMS et al., 2009).

CONCLUSIONS

The communities of cultivable bacteria of the samples studied comprise mainly species already described that may be associated with distinct zones in the water column, characterized by nutrient enrichment or higher salinity. The class Gammaproteobacteria dominates the cultivable community, along with Alphaproteobacteria and Bacilli, with the genera *Bacillus*, *Halomonas*, *Alteromonas*, *Salinicola*, *Erythrobacter* and *Pseudoalteromonas* being the most frequently identified.

Acknowledgments

We would like to thank the captain, the crew of the vessel Antares and the Brazilian Navy, for the support during the cruise. We are grateful for Dr. José Angel Alvarez Perez coordinator of the project “Patterns and Processes of the Ecosystems of the Southern Mid-Atlantic” – Census of Marine Life (CoML), for the support to the cruise and to Estácio Jussie Odisi and Felipe Araújo Teixeira Paulo for the collection of the samples. We also acknowledge the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) and

the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Process 577915/2008-8) for financial support.

REFERENCES

ABDALLAH, F. B.; ELLAFI, A.; LAGHA, R.; KALLEL, H.; BAKHROUF, A. Virulence gene expression, proteins secreted and morphological alterations of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in response to long-term starvation in seawater. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 7, p. 792-801, 2011.

AMIN, S. A.; GREEN, D. H.; WAHEEB, D. A.; GÄRDES, A.; CARRANO, C. J. Iron transport in the genus *Marinobacter*. **Biometals**, v. 25, p. 135-147, 2012.

BOWMAN, J. P. Methods for psychrophilic bacteria. **Methods in Microbiology**, v. 30, p. 591-614, 2001.

BRINKHOV, T.; GIEBEL, H. A.; SIMON, M. Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 531–539, 2008.

BULL, A. T.; STACH, J. E. M.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Marine Actinobacteria; perspectives, challenges, future directions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 65-79, 2005.

CHO, J. C.; STAPELS, M. D.; MORRIS, R. M.; VERGIN, K. L.; SCHWALBACH, M. S.; GIVAN, S. A.; BAROFSKY, D. F.; GIOVANNONI, S. J. Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine Gammaproteobacteria. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1456–1463, 2007.

D'ONOFRIO, A.; CRAWFORD, J. M.; STEWART, E. J.; WITT, K.; GAVRISH, E.; EPSTEIN, S.; CLARDY, J.; LEWIS, K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 254–264, 2010.

DICK, G. J.; TEBO, B. M. Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1334–1347, 2010.

FINNEGAN, L.; GARCIA-MELGARES, M.; GMEREK, T.; HUDDLESTON, W. R.; PALMER, A.; ROBERTSON, A.; SHAPIRO, S.; UNKLES, S. E. A survey of culturable aerobic and anaerobic marine bacteria in de novo biofilm formation on natural substrates in St. Andrews Bay, Scotland. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, p. 399–404, 2011.

FU, Y.; LI, Q.; LIU, K.; XU, Y.; WANG, Y.; JIAO, N. *Paracoccus oceanense* sp. nov., Isolated from the West Pacific. **Current Microbiology**, v. 63, p. 561–567, 2011.

GÄRTNER, A.; BLÜMEL, M.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Isolation and characterization of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, p. 421-435, 2011.

GHOSH, A.; BHARDWAJ, M.; SATYANARAYANA, T.; KHURANA, M.; MAYILRAJ, S.; JAIN, R. K. *Bacillus lehensis* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 238–242, 2007.

GIOVANNONI, S.; STINGL, U. The importance of culturing bacterioplankton on the 'omics' age. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 820-826, 2007.

GIUDICE, A. L.; CARUSO, C.; MANGANO, S.; BRUNI, V.; DOMENICO, M. D.; MICHAUD, L. Marine bacterioplankton diversity and community composition in an antarctic coastal environment. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 210–223, 2012.

IVANOVA, E. P.; GORSHKOVA, N. M.; SAWABE, T.; ZHUKOVA, N. V.; HAYASHI, K.; KURILENKO, V. V.; ALEXEEVA, Y.; BULJAN, V.; NICOLAU, D. V.; MIKHAILOV, V. V.; CHRISTEN, R. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 475–480, 2004.

IVANOVA, E. P.; ROMANENKO, L. A.; CHUN, J.; MATTE, M. H.; MATTE, G. R.; MIKHAILOV, V. V.; SVETASHEV, V. I.; HUQ, A.; MAUGEL, T.; COLWELL, R. R. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 901–907, 2000.

IVARS-MARTINEZ, E.; MARTIN-CUADRADO, A. D'AURIA, G.; MIRA, A.; FERRIERA, S.; JOHNSON, J.; FRIEDMAN, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. **The ISME Journal**, v. 2, p. 1194–1212, 2008.

KHAN, S. T.; TAKAICHI, S.; HARAYAMA, S. *Paracoccus marinus* sp. nov., an adonixanthin diglucoside-producing bacterium isolated from coastal seawater in Tokyo Bay. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 383–386, 2008.

KIM, B. S.; KIM, C. T.; PARK, B. H.; KWON, S.; CHO, Y. J.; KIM, N.; KIM, C. J.; CHUN, J.; KWAK, J.; MAENG, J. S. Draft genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* M1-1, isolated from the gills of a Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, after high hydrostatic pressure processing. **Journal of Bacteriology**, v. 194 n. 16 p. 4441–4442, 2012.

KIM, K. K.; JIN, L.; YANG, H. C.; LEE, S. T. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 675–681, 2007.

KIRCHMAN, D. L. **Microbial ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2008.

KLOOS, W. E.; WOLFSHOHL, J. F. *Staphylococcus cohnii* Subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 2, p. 284-289, 1991.

KOBLÍZEK, M.; BÉJÀ, O.; BIDIGARE, R. R.; CHRISTENSEN, S.; BENITEZ-NELSON, B.; VETRIANI, C.; KOLBER, M. K.; FALKOWSKI, P. G.; KOLBER, Z. S. Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 5, p. 327-338, 2003.

KOEHLER, T. M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. **Mol Aspects Med.**, v. 30, n. 6, p. 386–396, 2009.

KUMAR, N. Origin of “paired” assismic ridges: Ceará and Sierra Leone Rises in Equatorial Atlantic and Rio Grande Rise and Walvis Ridge in South Atlantic. **Marine Geology**, v. 30, n. 3-4, p. 175-191, 1979.

LEE, H. S.; KWON, K. K.; KANG, S. G.; CHA, S. S.; KIM, S. J.; LEE, J. H. Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 353–357, 2010.

LÜCKERA, S.; WAGNERA, M.; MAIXNERA, F.; PELLETIERB, E.; KOCHA, H.; VACHERIE, B.; RATTEIE, T.; DAMSTÉF, J. S. S.; SPIECKG, E.; PASLIERB, D. L.; DAIMS, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **PNAS**, v. 107, n. 30, p. 13479–13484, 2010.

MA, Y.; ZENG, Y.; JIAO, N.; SHI, Y.; HONG, N. Vertical distribution and phylogenetic composition of bacteria in the Eastern Tropical North Pacific Ocean. *Microbiological Research*, v. 164, p. 624-633, 2009.

MOHRIAK, W. U.; NÓBREGA, M. ODEGARD, M. E.; GOMES, B. S.; DICKSON, W. G. Geological and geophysical interpretation of the Rio Grande Rise, south-eastern Brazilian margin: extensional tectonics and rifting of continental and oceanic crusts. **Petroleum Geoscience**, v. 16, p. 231–245, 2010.

NA, H.; KIM, O. S.; YOON, S. H.; KIM, Y.; CHUN, J. Comparative approach to capture bacterial diversity of coastal waters. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 729-740, 2011.

NUNOURA, T.; SOFFIENTINO, B.; BLAZEJAK, A.; KAKUTA, J.; OIDA, H.; SCHIPPERS, A.; TAKAI, K. Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope (IODP Expedition 308). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 410–424, 2009.

O’SULLIVAN, L. A.; FULLER, K. E.; THOMAS, E. M.; TURLEY, C. M.; FRY, J. C.; WEIGHTMAN, A. J. Distribution and culturability of the uncultured ‘AGG58’

cluster of the Bacteroidetes phylum in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 359-370, 2004.

OLIVERA, N.; SINERIZ, F.; BRECCIA, J. D. *Bacillus patagoniensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from the rhizosphere of *Atriplex lampa* in Patagonia, Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 443–447, 2005.

ORCUTT, B. N. SYLVAN, J. B.; KNAB, N. J.; EDWARDS, K. J. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 361–422, 2011.

PARSONS, T. R.; MAITA, Y.; LALLI, C. M. **A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis**. Pergamon Press, Oxford, 1989, 173p.

PETTIT, R. K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 1–11, 2011.

PINHASSI, J.; BOWMAN, J. P.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; LEKUNBERRI, I.; GOMEZ-CONSARNAU, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C. *Leeuwenhoekella blandensis* sp. nov., a genome-sequenced marine member of the family Flavobacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, 1489–1493, 2006.

POLYMENAKOU, P. N.; LAMPADARIOU, N.; MANDALAKIS, M.;

TSELEPIDES, A. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 17–26, 2009.

PRABAGARAN, S. R.; MANORAMA, R.; DELILLE, D.; SHIVAJI, S. Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected of Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 342–355, 2007.

PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: SONENSHEIN, A. L.; LOSICK, R. (ed) ***Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics**. Washington; AMS Press, 1993.

QIN, Q. L.; ZHANG, X. Y.; WANG, X. M.; LIU, G. M.; CHEN, X. L.; XIE, B. B.; DANG, H. Y.; ZHOU, B. C.; YU, J.; ZHANG, Y. Z. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. **BMC Genomics**, v. 11, p. 247-257, 2010.

QIN, Q. L.; ZHAO, D. L.; WANG, J.; CHEN, X. L.; DANG, H. Y.; LI, T. G.; ZHANG, Y. Z.; GAO, P. J. *Wangia profunda* gen.nov., sp.nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from southern Okinawa Trough deep-sea sediment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, p. 53–58, 2007.

QUAN, Z. X.; XIAO, Y. P.; ROH, S. W.; NAM, Y. D.; CHANG, H. W.; SHIN, K. S.; RHEE, S. K.; PARK, Y. H.; BAE, J. W. *Joostella marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from the East Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1388–1392, 2008.

RAFIDINARIVO, H. F.; FUJIMOTO, S.; WATANABE, K.; KITAZATO, K.; KOBAYASHI, N. Topographic effects of coastal seas on the composition of the

culturable bacterial communities in marine sediments. **Hydrobiologia**, v. 583, p. 205-212, 2007.

RATHGEBER, C.; LINCE, M. T.; ALRIC, J.; LANG, A. S.; HUMPHREY, E.; BLANKENSHIP, R. E.; VERMÉGLIO, A.; PLUMLEY, F. G.; VAN DOVER, C. L.; BEATTY, J. T.; YURKOV, V. Vertical distribution and characterization of aerobic phototrophic bacteria at the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. **Photosynth Res.**, v. 97, n. 3, p. 235-244, 2008.

RHEINHEIMER, G. **Microbiología de las aguas**. Zaragoza: Acribia, 1987

ROH, S. W.; NAM, Y. D.; CHANG, H. W.; KIM, K. H.; KIM, M. S.; SHIN, K. S.; YOON, J. H.; OH, H. M.; BAE, J. W. *Paracoccus aestuarii* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 790–794, 2009.

SFANOS, K.; HARMODY, D.; DANG, P.; LEDGER, A.; POMPONI, S.; MCCARTHY, P.; LOPEZ, J. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 242–264, 2005.

SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; SURESH, K.; REDDY, G. S.; DUTT, C. B.; WAINWRIGHT, M.; NARLIKAR, J. V.; BHARGAVA, P. M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1465-1473, 2006.

SILVA, M. A. C.; CAVALETT, A.; SPINNER, A.; ROSA, D. C.; JASPER, R. B.; QUECINE, M. C.; BONATELLI, M. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; CORÇÃO, G.; LIMA, A. O. S. Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-

sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. **SpringerPlus**, v. 2, p. 127, 2013.

SIMS, D.; BRETTIN, T.; DETTER, J. C.; HAN, C.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; RIO, T. G. D.; NOLAN, M.; CHEN, F.; LUCAS, S.; TICE, H.; CHENG, J. F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; D'HAESELEER, P.; CHAIN, P.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; SCHNEIDER, S.; GÖKER, M.; PUKALL, R.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P. Complete genome sequence of *Kytococcus sedentarius* type strain (541T). **Standards in Genomic Science**, v. 1, p. 12-20, 2009.

SKOVHUS, T. L.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; DAHLLÖF, I. Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p. 348–361, 2007.

SMEDILE, F.; MESSINA, E.; CONO, V. L.; TSOY, O.; MONTICELLI, L. S.; BORGHINI, M.; GIULIANO, L.; GOLYSHIN, P. N.; MUSHEGLAN, A.; YAKIMOV, M. M. Metagenomic analysis of hadopelagic microbial assemblages thriving at the deepest part of the Mediterranean Sea, Matapan-Vavilov Deep. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 167-182, 2013.

STINGL, U.; DESIDERIO, R. A.; CHO, J. C.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. The SAR92 Clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2290–2296, 2007.

STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A **Practical Handbook of Seawater Analysis**. Fisheries Research. Board of Canada Bulletin. 2nd Edition, 1-311, 1972.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. **Method. Molecul. Biol, Evol.**, v. 28, p. 2731-2739, 2005.

WARD, A. C.; BORA, N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 279-286, 2006.

ZHANG, J.; ZHANG, E.; SCOTT, K.; BURGESS, J. G. Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, n. 5, p. 2984–2992, 2012.

Table 1. Localization and depths of each sample studied. All samples were processed in 11/24/2011.

Sample	Station	Depth (m)	Sampling date
1	4	Surface	11/12/2011
2	4	50	11/12/2011
3	4	200	11/12/2011
4	4	3600	11/12/2011
5	6	Surface	11/13/2011
6	6	50	11/13/2011
7	6	200	11/13/2011
8	6	1500	11/13/2011
9	11	Surface	11/15/2011
10	11	50	11/15/2011
11	11	200	11/15/2011
12	11	900	11/15/2011
13	14	Surface	11/17/2011
14	14	50	11/17/2011
15	14	200	11/17/2011
16	14	1500	11/17/2011

Table 2. Description, similarity percentage and number of strains for each operational taxonomic unit (OTU) identified in the present study.

OTU	Description	Similarity	N. of strains
Gammaproteobacteria			
1	<i>Salinicola salarius</i>	99%	6
2	<i>Halomonas axialensis</i>	99-100%	5
3	<i>Halomonas meridiana</i>	99-100%	4
4	<i>Alteromonas macleodii</i>	99%	5
5	<i>Alteromonas marina</i>	99%	2
6	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	98-99%	4
7	<i>Idiomarina zobellii</i>	98-99%	2
8	<i>Idiomarina abyssalis</i>	99%	1
9	<i>Marinobacter flavimaris</i>	99%	1
10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	1
11	<i>Vibrio gigantis</i>	99%	1
Alphaproteobacteria			
12	<i>Erythrobacter citreus</i>	98-99%	3
13	<i>Erythrobacter flavus</i>	99%	2
14	<i>Henriciella marina</i>	98%	1
15	<i>Paracoccus alkenifer</i>	97%	1
16	<i>Paracoccus homiensis</i>	95%	1
17	<i>Paracoccus versutus</i>	95%	1
18	<i>Sulfitobacter delicatus</i>	99%	1
19	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	99%	1
Bacilli			
20	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99-100%	5
21	<i>Bacillus lehensis</i>	99%	2
22	<i>Bacillus patagoniensis</i>	97-98%	2
23	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	1
24	<i>Bacillus anthracis</i>	100%	1
25	<i>Bacillus firmus</i>	99%	1
26	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	100%	1
27	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	99%	1
Flavobacteriia			
28	<i>Zunongwangia profunda</i>	99%	3
29	<i>Joostella marina</i>	99%	2
30	<i>Krokinobacter genikus</i>	99%	2
31	<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i>	98%	1
Actinobacteria			
32	<i>Brevibacterium casei</i>	99%	1
33	<i>Kytococcus sedentarius</i>	99%	1
34	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	1

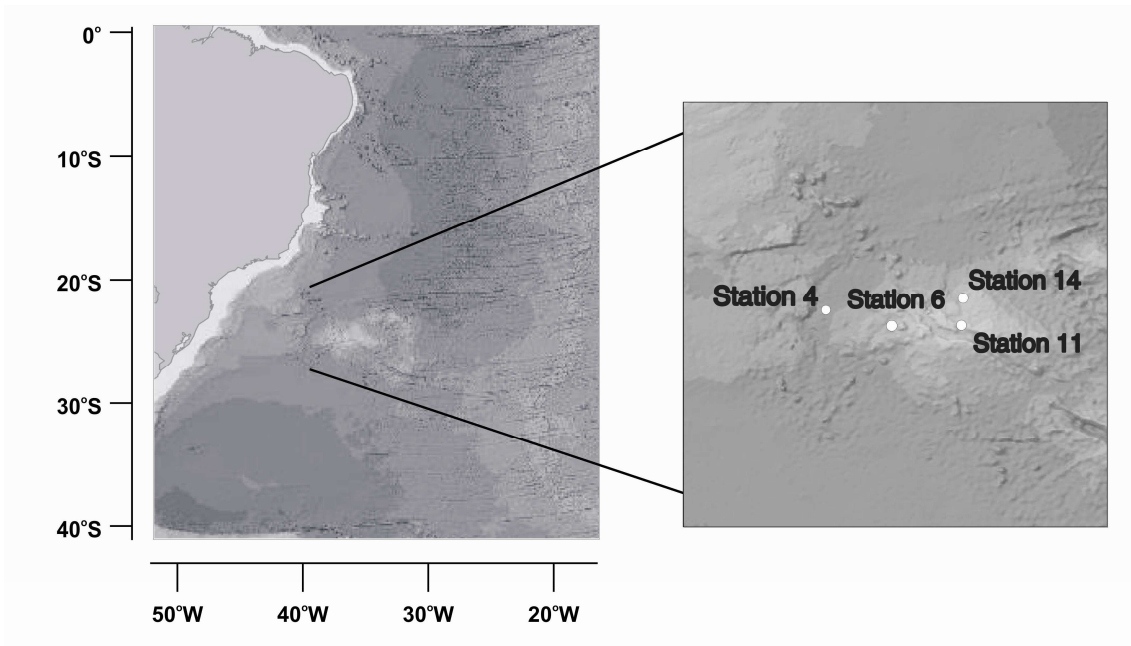


Figure 1. The Rio Grande rise, with the four sampling stations marked (source: Google Earth).

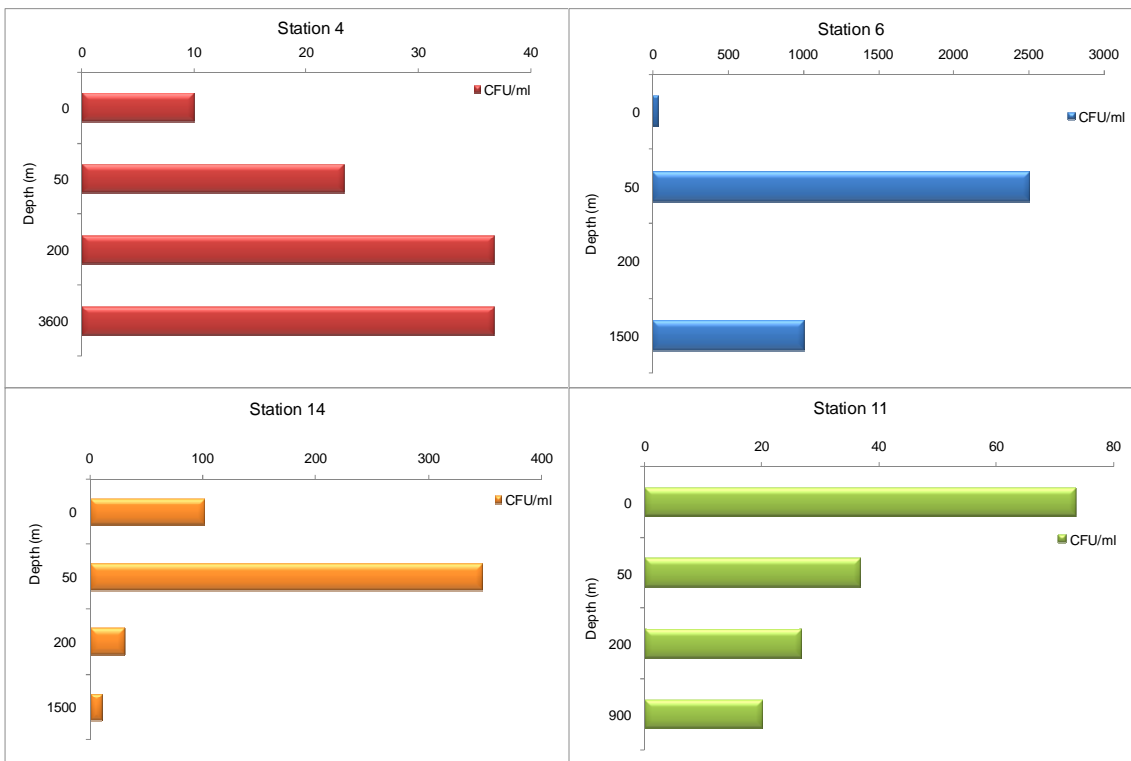


Figure 2. Vertical profiles of colony forming units per millilitre (CFU/ml) for all stations.

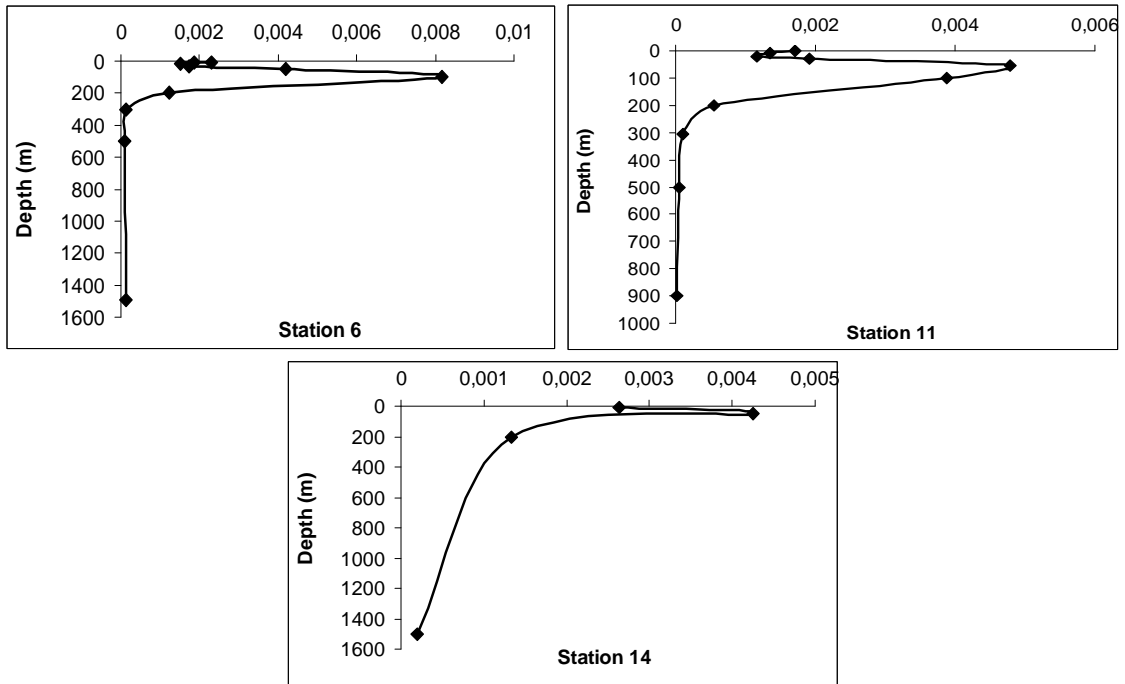


Figure 3. Vertical profiles of Chlorophyll-a ($\mu\text{g/l}$) for stations 6, 11 and 14.

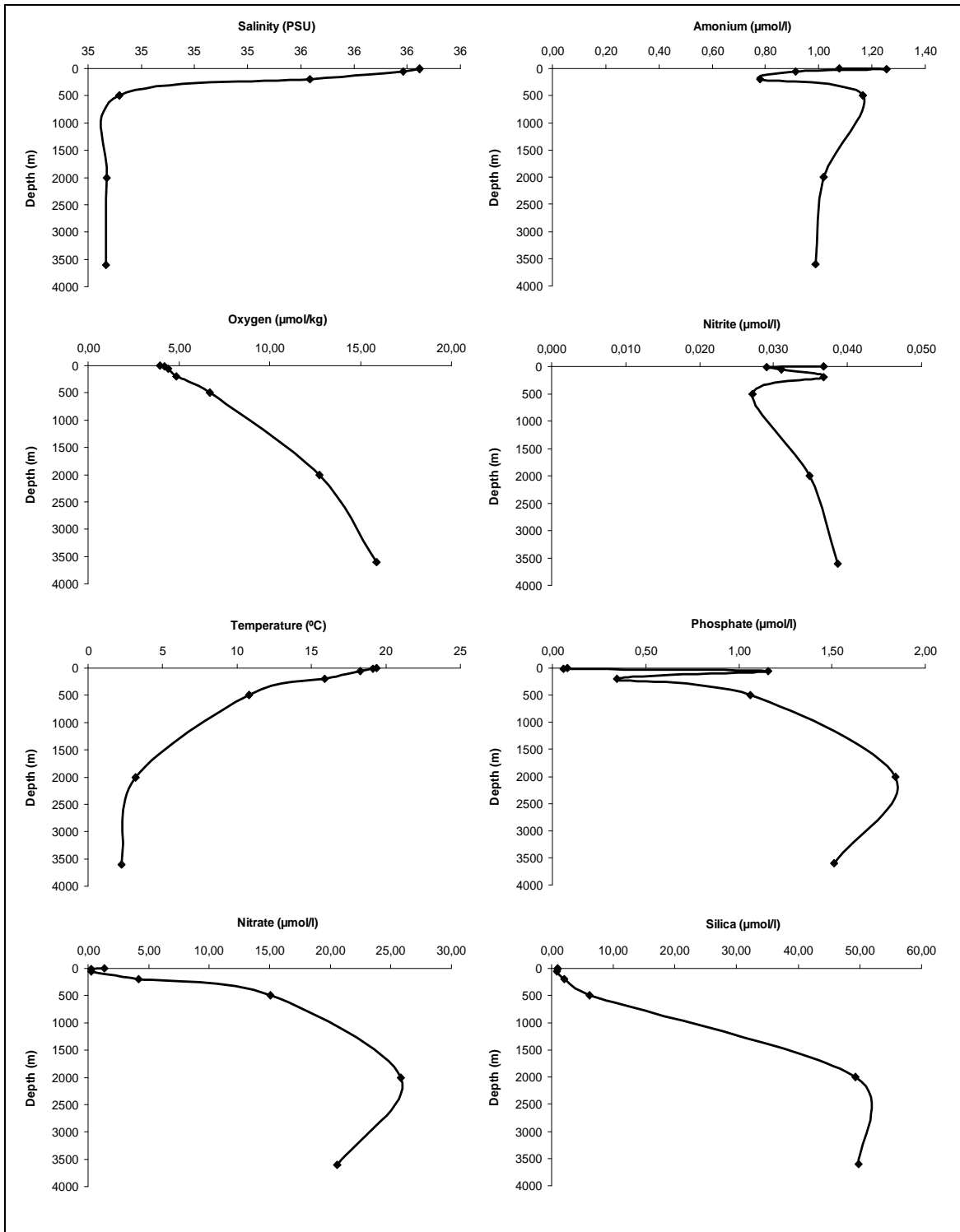


Figure 4. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 4.

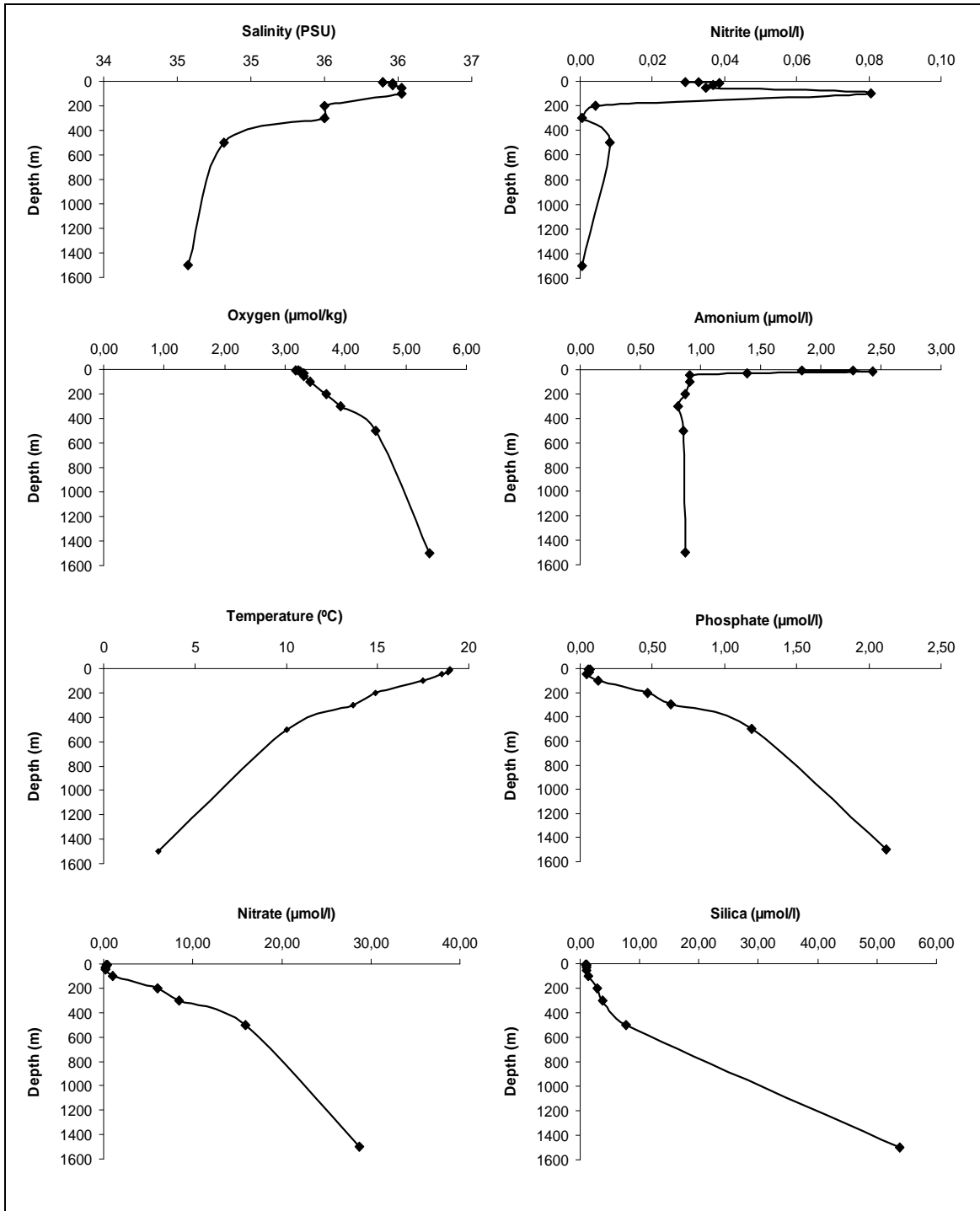


Figure 5. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 6.

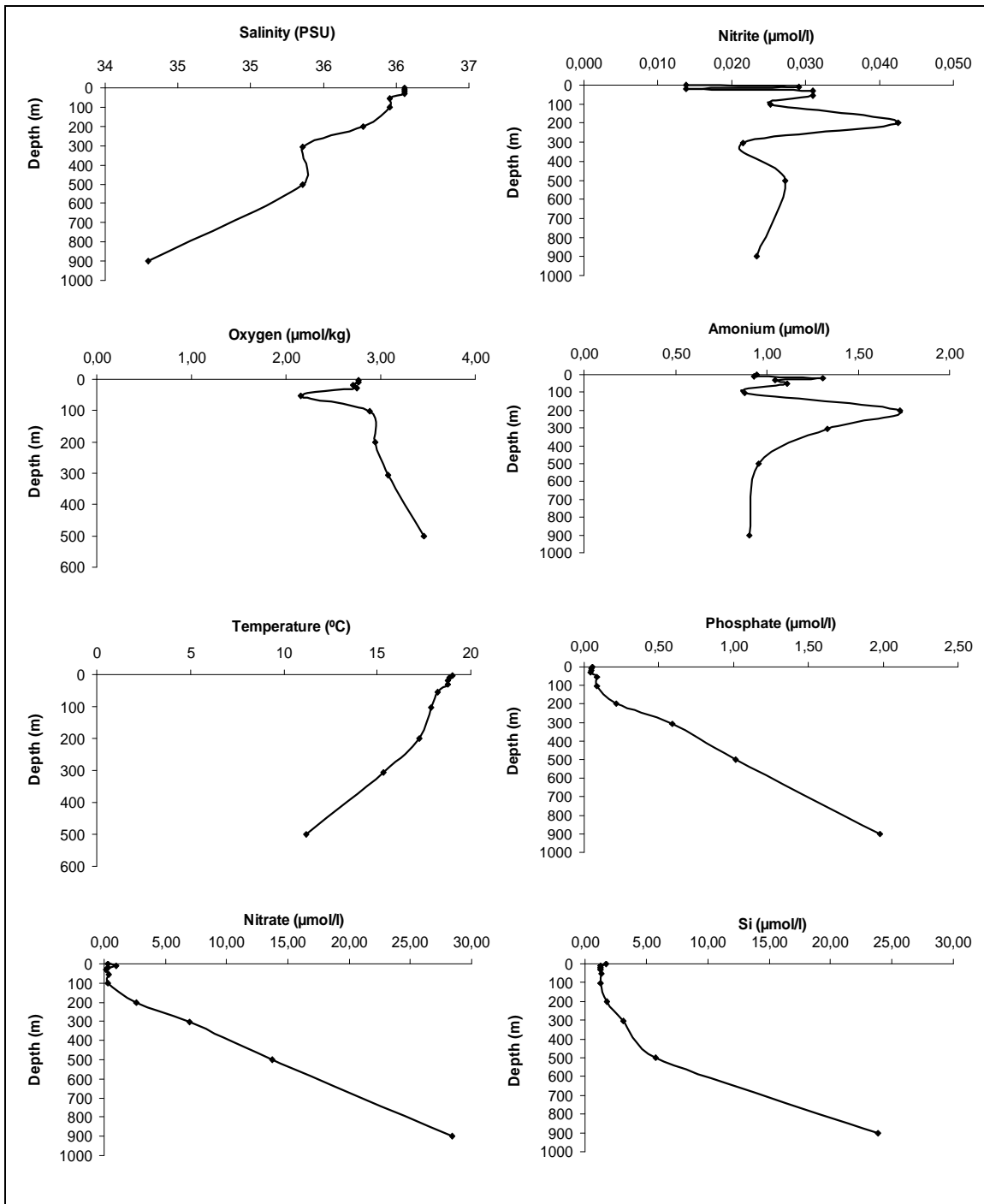


Figure 6. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 11.

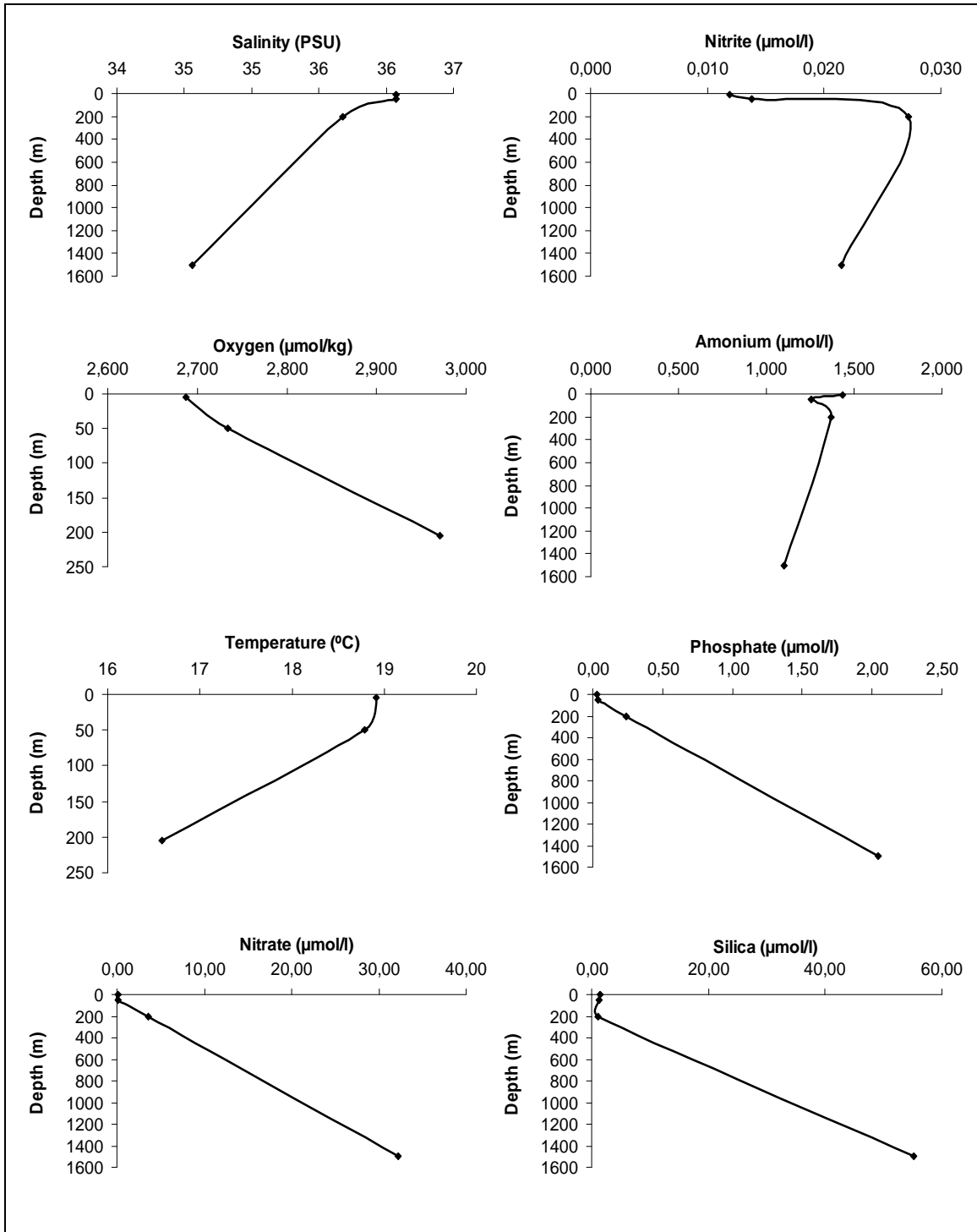


Figure 7. Vertical profiles of salinity, dissolved oxygen, temperature and nutrients for sampling station 14.

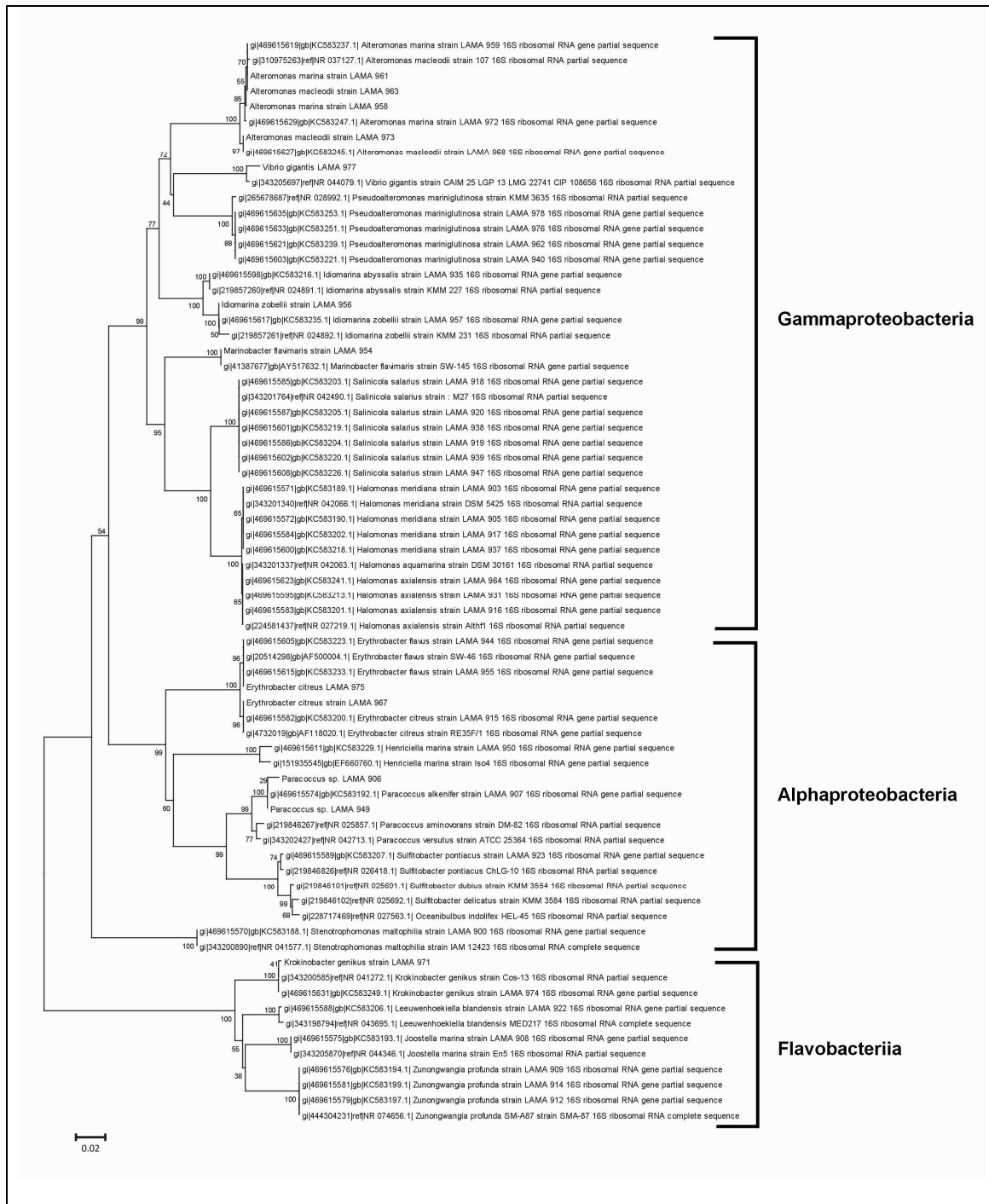


Figure 8. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences of Gram-negative strains.

Legend: Bootstrap support values are shown. The scale bar indicates evolutionary distance.

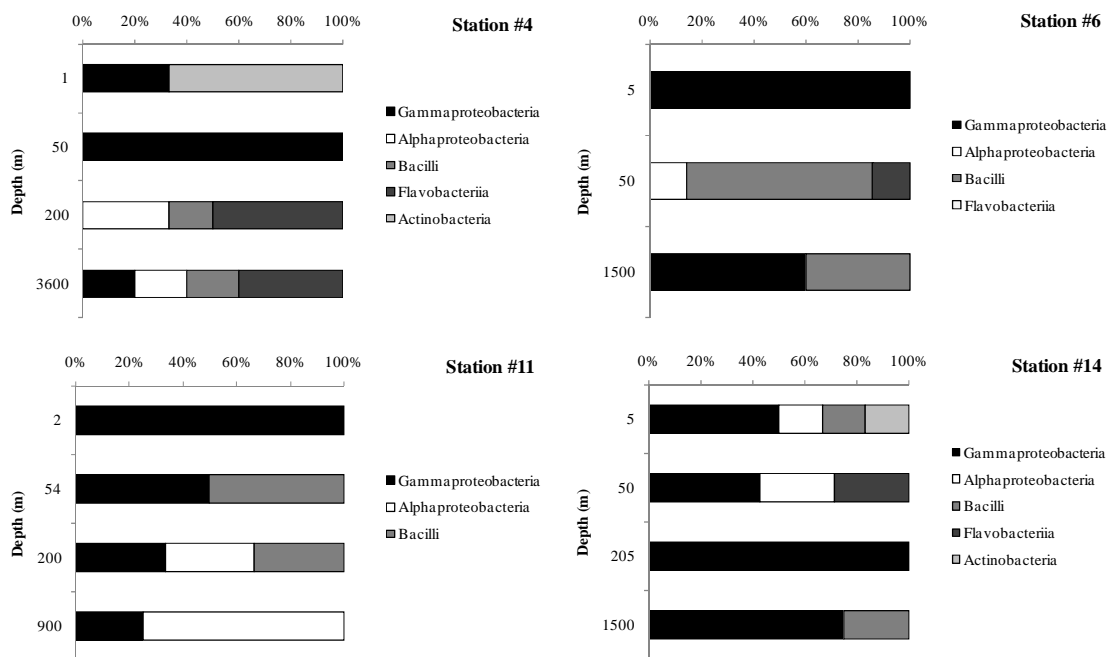


Figure 5. Vertical distribution of the bacterial classes identified at the four sampling stations.

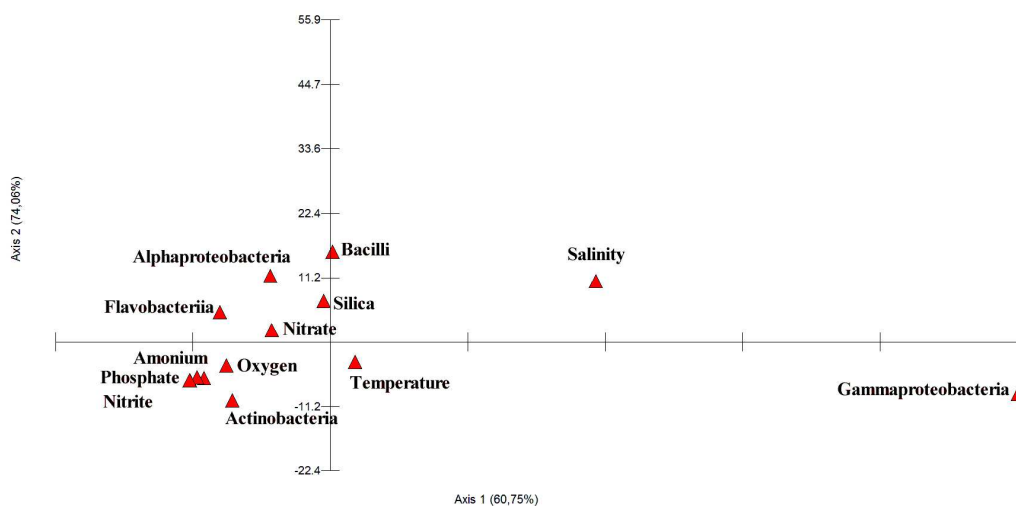


Figure 6. Ordination produced from PCA of the chemical variables and the bacterial classes. The cumulative percentage of variance explained by each factor extracted is showed.

3.3. Artigo 3: Atividade Lipolítica e Endoglucanólítica de Bactérias Isoladas de Águas da Região da Elevação do Rio Grande e de Sedimentos do Leste do Oceano Atlântico Sul

Artigo submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Aquatic Sciences and Technology

TÍTULO: ATIVIDADE LIPOLÍTICA E ENDOGLUCANOLÍTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO GRANDE E DE SEDIMENTOS DO LESTE DO OCEANO ATLÂNTICO SUL

TÍTULO BREVE: ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE BACTÉRIAS OCEÂNICAS

Autores: Marcus Adonai Castro da Silva¹; Rodrigo Penque¹; Aline Diniz¹; Gertrudes Corção²; André Oliveira de Souza Lima³.

¹Laboratório de Microbiologia Aplicada, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, CEP 88302202, Itajaí-SC, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Cidade Baixa, CEP 90050-170 Porto Alegre-RS, Brazil.

³Laboratório de Genética Molecular, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, CEP 88302202, Itajaí-SC, Brazil.

TÍTULO: ATIVIDADE LIPOLÍTICA E ENDOGLUCANOLÍTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUAS DA REGIÃO DA ELEVAÇÃO DO RIO GRANDE E DE SEDIMENTOS DO LESTE DO OCEANO ATLÂNTICO SUL

TÍTULO BREVE: ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE BACTÉRIAS OCEÂNICAS

Abstract

The lipolytic and endoglucanolytic activity was evaluated in 212 bacteria isolated from water samples of the Rio Grande Rise and sediments of the eastern South Atlantic Ocean. By plate assays, it was observed that a large part of the microorganisms (67.9%) was capable of lipid hydrolysis, but only a small group of bacteria (4.7%) showed endoglucanolytic activity. A significant higher percentage of lipolytic strains could be isolated by direct plating on Marine Agar supplemented with a lipid. There was no difference on the percentage of lipolytic microorganisms between type of samples or the depths at the water column. The classes Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Bacilli included a higher percentage of lipolytic strains. Some genera of these classes, including *Halomonas* and *Bacillus*, were capable of hydrolyzing all four lipids (Tween20, 40, 60 and 80). While the genera *Erythrobacter* and *Alteromonas* displayed a higher lipolytic activity, *Stenotrophomonas* and *Joostella* showed lipolytic activity at cold (5⁰C) temperatures. Most of the endoglucanolytic strains belonged to the species *Bacillus stratosphericus*. All these organisms have potential for the industrial production of enzymes and should be studied further.

Palavras-chave: Oceanic bacteria; Lipase; Endoglicanase; South Atlantic.

Introdução

A matéria orgânica constitui o principal doador de elétrons utilizado pelos micro-organismos que habitam as zonas profundas dos oceanos (Orcutt et al., 2011) e pode ser dividida de acordo com a sua susceptibilidade ao ataque microbiano em superlável, lábil e recalcitrante (Fenchel et al., 2012). Entre estas categorias, a fração lábil é formada por polímeros como polissacarídeos e lipídeos, que, devido ao tamanho superior a 600 Da, necessitam de um ataque enzimático extracelular para serem assimiladas. Apesar da utilização preferencial da fração superlável pelos micro-organismos (Arnosti, 2011), as moléculas de alta massa molecular são mais abundantes no ambiente marinho, perfazendo de 16 a 30% de todo o carbono orgânico dissolvido de águas superficiais (Repeta et al., 2002), e decaindo ligeiramente em águas profundas (18 a 25%, McCarthy, 1996). Uma vez que a utilização de compostos maiores que 600 Da está condicionada à hidrólise extracelular, a produção de enzimas hidrolíticas é fundamental para a nutrição de muitos micro-organismos marinhos e para a ciclagem do carbono (Fenchel, 2012).

A produção de enzimas hidrolíticas pelos micro-organismos marinhos tem sido bastante estudada. Yu et al. (2009), por exemplo, estudaram bactérias isoladas do gelo marinho do ártico quanto a produção de sete enzimas hidrolíticas. As enzimas mais comumente produzidas foram lipase e protease, sendo que estes organismos apresentaram uma ampla distribuição filogenética. Dang et al. (2009) estudaram 98 isolados bacterianos de sedimentos profundos, observando que 72,4% das linhagens apresentaram algum tipo de atividade hidrolítica, incluindo lipolítica, proteolítica e amilolítica.

O interesse pelas enzimas hidrolíticas de micro-organismos marinhos não se deve apenas à sua importância ecológica. Estas enzimas podem ser novas ou similares às de organismos terrestres, porém com propriedades diferentes, como alta tolerância aos sais e ao frio (Debashish et al., 2005). De qualquer maneira, as enzimas são importantes catalisadores que têm sido cada vez mais empregadas em uma variedade de setores industriais, que incluem a produção de detergentes (Nerurkar et al., 2013), o processamento têxtil (Hasan et al., 2006) e a produção de biocombustíveis (Tan et al., 2010). Neste último caso, duas classes de enzimas são visadas, as lipases e as celulasas.

As enzimas que atuam sobre lipídeos incluem as lipases e as esterases. As esterases atuam sobre substratos hidrossolúveis de cadeia curta, enquanto que as lipases atuam normalmente em substratos mais hidrofóbicos, com cadeias de carbono mais longas (Karpushova et al., 2005). Apesar desta diferenciação, muitas lipases podem apresentar atividade similar a das esterases, o que dificulta a separação destas enzimas (Lotti & Alberghina, 2007). Neste trabalho o termo lipase será empregado para ambos os tipos de enzimas. As lipases têm sido empregadas na produção de biodiesel, especificamente na catalisação de reações de transesterificação de ácidos graxos com alcoóis de cadeia curta (Tan et al., 2010).

As celulasas, por outro lado, são enzimas que degradam fibras de celulose, e têm sido utilizadas na sacarificação de resíduos ricos neste polímero vegetal, para sua conversão em etanol (Intriago, 2012). Estas enzimas incluem as endoglicanases (ou endo-1,4- β -D-glicanase), que atuam aleatoriamente sobre porções mais amorfas das fibras de celulose. Neste contexto, o presente trabalho objetivou a avaliação da atividade lipolítica e endoglicanolítica de

bactérias de amostras de água, coletadas na região da Elevação do Rio Grande, e de sedimentos, coletados na parte leste do Oceano Atlântico Sul.

Material e Métodos

Amostragem, enriquecimento e isolamento de micro-organismos

As amostras estudadas foram coletadas durante um embarque realizado entre os dias 08/11/2011 e 17/11/2011 com o navio Antares da Marinha do Brasil. Dezesesseis amostras de água foram coletadas de quatro estações, em quatro profundidades diferentes (Figura 1). As amostras foram coletadas com garrafas de Ninski e assepticamente transferidas para tubos Falcon de 15 ml contendo Tween20 ou carboximetilcelulose (CMC) (0,5%, concentração final) a bordo, e mantidas a 4^oC para os enriquecimentos de bactérias lipolíticas (Tween20) e endoglucanólíticas (CMC).

As bactérias foram isoladas a partir das amostras enriquecidas em placas de Petri contendo Meio Marinho Mínimo sólido (Baumann et al., 1971) suplementado com Tween20 ou CMC a 0,5%, incubadas a 10^oC por duas semanas. Após a incubação, colônias de diferentes morfologias de cada placa foram repicadas sucessivamente até a obtenção de culturas puras. Os micro-organismos isolados foram então armazenados em tubos de ensaio contendo Ágar Marinho, sendo repicados a cada dois meses.

Outros micro-organismos estudados

Para a avaliação da atividade lipolítica e endoglucanolítica foram utilizadas, além das bactérias obtidas a partir dos enriquecimentos, 135 linhagens

previamente isoladas e mantidas no laboratório. Setenta destas linhagens foram isoladas de sedimentos profundos de amostras obtidas na região leste do Atlântico Sul (Silva et al., 2013), tendo sido obtidas de três meios distintos, o Ágar Marinho (AM), Ágar Marinho suplementado com Tween40 (0,5%, AM+Tween40) e Ágar Marinho suplementado com CMC (0,5%, AM+CMC). Os 65 restantes compreendem linhagens isoladas das mesmas amostras utilizadas no enriquecimento, em um estudo a parte. Estas foram obtidas de placas contendo Ágar Marinho Diluído (1:5). Todas estas 135 linhagens foram obtidas sem o enriquecimento prévio da amostra e 131 delas foram identificadas pela análise de genes 16S rRNA.

Determinação das atividades lipolíticas e endoglucanólítica

A atividade hidrolítica de todos os micro-organismos estudados foi determinada inoculando-se, pontualmente e em triplicata, placas de Petri contendo Agar Marinho suplementado com Tween20, Tween40, Tween60 e Tween80, para atividade lipolítica (Smibert & Krieg, 1994), e Ágar Marinho Basal (Baumann et al., 1971) suplementado com 0,5% CMC, para atividade endoglucanólítica (Kluepfel, 1988). As placas inoculadas foram incubadas a 30^oC por uma semana, e a 15 e 5^oC por duas semanas, nos experimentos com diferentes temperaturas (conduzido com 56 linhagens isoladas de amostras de água da Elevação do Rio Grande). Transcorrida a incubação, as placas foram examinadas em relação à presença de zonas de hidrólise em torno das colônias. A hidrólise de lipídeos foi evidenciada pela precipitação de cristais em torno das colônias. Para a visualização da hidrólise de CMC as placas foram coradas com solução (0,1%) de vermelho do congo por 20 minutos e lavadas

com NaCl 5M por mais 20 minutos (Kluepfel, 1988). Os diâmetros dos halos de hidrólise (H), e das respectivas colônias (C) com atividade hidrolítica, foram medidos (em milímetros) e utilizados para calcular índices de atividade enzimática (IE) segunda a fórmula: $IE = H/C$ (Hankin & Anagnostakis, 1975). Estes valores foram utilizados nas análises dos dados.

Análise dos dados

As porcentagens de linhagens com atividade hidrolítica sobre cada substrato foram comparadas entre tipos de amostras, entre diferentes profundidades da coluna d'água, entre tipos de meios sólidos e entre os métodos de isolamento (com enriquecimento e inoculação direta em meio sólido). As linhagens também foram comparadas em relação com seus respectivos índices enzimáticos. Para todas estas comparações foi utilizada a Análise de Variância (ZAR, 2009). Tendo encontrado variação significativa nos dados, o teste de Duncan *post hoc* foi conduzido para averiguar quais tratamentos ou organismos diferiram dos restantes. Neste caso foram considerados significantes valores de p inferiores a 0,05. Esta análise foi realizada com o software Statistica versão 8.0.

Resultados

A partir dos enriquecimentos realizados, foram isoladas 77 linhagens de bactérias, sendo 38 obtidas a partir dos enriquecimentos com CMC e 39 dos enriquecimentos com Tween20. O número de linhagens obtidas por amostra por estes procedimentos variou de 0 a 5. Do total de 212 linhagens estudadas, 67,9% apresentaram algum tipo de atividade hidrolítica. O substrato mais

hidrolisado pelos micro-organismos foi o Tween20 (55,7% das linhagens), seguido do Tween60 (54,2%), Tween40 (52,4%), Tween 80 (28,3%) e, por último, CMC (4,7%).

Os métodos de isolamento foram comparados em relação à atividade lipolítica. Para isto foram utilizadas apenas as linhagens isoladas por inoculação direta em meio sólido (n = 65), obtidas das amostras da Elevação do Rio Grande, uma vez que estas foram as mesmas amostras utilizadas para o enriquecimento. A porcentagem de micro-organismos com atividade lipolítica foi maior entre os isolados obtidos por isolamento direto, para os quatro lipídeos testados ($p < 0,0201$) (Figura 2). Considerando as bactérias obtidas por enriquecimento com CMC os valores também foram maiores, porém somente para a atividade hidrolítica sobre os substratos Tween40 e 60 ($p < 0,01967$). Por último, a porcentagem de linhagens com atividade lipolítica também foi maior nos micro-organismos obtidos por enriquecimento com CMC em comparação com as bactérias obtidas por enriquecimento com Tween20, porém esta diferença só foi significativa em relação à atividade sobre os lipídeos Tween20 e 60 ($p < 0,01057$).

A porcentagem de micro-organismos de sedimentos com atividade hidrolítica foi maior entre as linhagens obtidas do meio sólido AM+Tween40, para os quatro substratos lipídicos (Figura 3). Porém esta diferença não foi testada estatisticamente, pois o número de linhagens por amostra foi baixo para os meios marinho suplementados (AM+Tween40 e AM+CMC).

Não foi observada nenhuma tendência específica na distribuição vertical dos micro-organismos com atividade lipolítica na coluna d'água, uma vez que os perfis foram distintos para cada uma das quatro estações (Figura 4).

As 131 linhagens identificadas compreenderam cinco classes bacterianas. Gammaproteobacteria é a classe mais bem representada, (n = 69), seguida de Bacilli (n = 39), Alphaproteobacteria (n = 11), Actinobacteria (n = 7) e Flavobacteriia (n = 5). A hidrólise dos substratos Tween40, 60 e 80 foi mais freqüente entre Alphaproteobacteria, enquanto que a hidrólise de Tween20 foi mais freqüente entre os isolados de Bacilli. De maneira geral, a capacidade hidrolítica dos isolados das classes Bacilli e Gammaproteobacteria foram similares. Os micro-organismos das classes Actinobacteria e Flavobacteriia foram os que apresentaram menor capacidade hidrolítica sobre os substratos lipídicos (Figura 5).

Os micro-organismos de catorze gêneros incluindo *Halomonas*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Henriciella* e *Stenotrophomonas* hidrolisaram os quatro substratos lipídicos testados (Tabela 1 e 2). Entretanto, variações foram observadas entre as diferentes linhagens destes gêneros.

Considerando os índices enzimáticos obtidos, foram selecionadas as linhagens que apresentaram maior atividade sobre cada substrato lipídico, com diferença estatística significativa em relação a todos os outros isolados (Tabela 3). Nesta avaliação, entre as linhagens identificadas, quatro se destacaram, sendo todas obtidas a partir de amostras de água, cada uma de uma profundidade diferente. Duas destas linhagens pertencem à espécie *Erythrobacter flavus*, uma à espécie *Erythrobacter citreus* e uma à espécie *Alteromonas macleodii*. Alguns organismos se destacaram em relação à atividade sobre um mesmo lipídeo, pois seus índices enzimáticos não diferiram estatisticamente, sendo os valores de p superiores a 0,055163 entre os isolados em destaque em relação ao

Tween40, e $p = 0,492203$ entre as linhagens LAMA915 e 955, que se destacaram em relação ao substrato Tween60.

Entre os micro-organismos obtidos por enriquecimento, duas linhagens se destacaram, não apenas entre as bactérias obtidas por este método, mas entre toda a coleção avaliada. LAMA 1042 apresentou o maior índice de atividade enzimática para os substratos Tween20 e 80 ($p = 0,000009$), enquanto que LAMA 1043 apresentou os maiores índices para os substratos Tween60 ($p = 0,000009$) e 40, não diferindo, neste último substrato, da linhagem *Erythrobacter citreus* LAMA 915 ($p = 0,767384$). Ambas as linhagens, LAMA 1042 e LAMA 1043, foram obtidas da mesma amostra de água, coletada a 50m na estação 14, da região da Elevação do Rio Grande.

Dos 56 organismos testados em relação à atividade hidrolítica, quando cultivados nas três temperaturas distintas, apenas dois organismos (3,6%) apresentaram atividade a 5°C. Oito organismos (14,3%) apresentaram atividade a 15°C e 27 (48,2%) apresentaram atividade a 30°C (Figura 6). As duas linhagens que apresentaram atividade lipolítica a 5°C foram *Stenotrophomonas maltophilia* LAMA 900 e *Joostella marina* LAMA 910, isoladas de superfície (LAMA 900) e de 200m de profundidade (LAMA 910), ambas amostras originadas da estação 4 da região da Elevação do Rio Grande. Estes dois micro-organismos não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,052034$), em relação aos índices enzimáticos obtidos a 5 e 15°C, diferindo nos índices obtidos a 30°C ($p = 0,022698$), sendo que *J. marina* LAMA 910 apresentou maiores índices enzimáticos a 30°C, em comparação com *S. maltophilia* LAMA 900 ($p < 0,05$).

Apenas dez linhagens de todos os isolados testados (n = 212) hidrolisaram CMC (Tabela 4), tendo sido todas originalmente isoladas em meio Ágar Marinho ou Ágar Marinho Diluído (1:5) sem enriquecimento. Destas dez linhagens, sete pertencem à espécie *B. stratosphericus* e incluem todos os quatro isolados de amostra de água que hidrolisaram CMC. Estas quatro linhagens foram isoladas da amostra coletada a 50m na estação 6 e todas também hidrolisaram os quatro substratos lipídicos testados. Três das seis linhagens de sedimento que hidrolisaram CMC também pertenciam à espécie *B. stratosphericus*, uma pertencia à espécie *Paenibacillus glucanolyticus* (LAMA 767), uma pertence ao gênero *Pseudoalteromonas* (LAMA 784) e uma linhagem não foi identificada (LAMA 670). A capacidade de hidrolisar os substratos lipídicos testados foi mais variável nas linhagens celulolíticas provenientes de sedimentos, sendo que três isolados hidrolisaram todos os substratos (*B. stratosphericus* LAMA 892, *Pseudoalteromonas* LAMA 784 e LAMA 670), duas apenas hidrolisaram o substrato Tween80 (*B. stratosphericus* LAMA 781 e *P. glucanolyticus* 767) e uma só hidrolisou o substrato Tween20 (*B. stratosphericus* LAMA 762). As seis linhagens de sedimento foram isoladas de cinco estações diferentes, de placas de Ágar Marinho, sendo *B. stratosphericus* LAMA 781 e *P. glucanolyticus* LAMA 767 provenientes da mesma estação de coleta. Considerando os índices de atividade enzimática sobre CMC, LAMA 670 apresentou o maior valor entre os dez micro-organismos, porém este valor só foi estatisticamente maior que os valores das linhagens *B. stratosphericus* LAMA 781 e *Pseudoalteromonas* sp. LAMA 784 ($p < 0,05$).

Discussão

Neste trabalho foi estudada a atividade lipolítica e endoglucanólítica de 212 micro-organismos. A porcentagem destes micro-organismos que apresentou algum tipo de atividade (67,9%) é similar a observada em trabalhos realizados por outros pesquisadores em ambientes marinhos profundos. Dang et al. (2009), por exemplo, observaram que 72,4% dos 98 organismos estudados de sedimentos profundos apresentaram alguma atividade hidrolítica. Por outro lado, Podgórskaa e Mudryk (2003) observaram que pelo menos 80% dos isolados apresentaram atividade hidrolítica sobre os substratos testados, valores estes maiores do que os observados no presente trabalho. Esta diferença pode estar relacionada com o fato de Podgórskaa e Mudryk (2003) terem estudado organismos de sedimentos estuarinos, que são ambientes mais ricos em matéria orgânica, inclusive terrestre. Isto poderia resultar na seleção de micro-organismos com maior capacidade hidrolítica. Além disso, estes pesquisadores estudaram a produção de outras enzimas não estudadas por nós, o que pode ter contribuído para a diferença nas porcentagens de micro-organismos com atividade hidrolítica.

Os micro-organismos isolados a partir dos enriquecimentos apresentaram atividade lipolítica inferior, em comparação com as bactérias obtidas por inoculação direta em meio sólido (Figura 2). Este resultado não era esperado, uma vez que o enriquecimento com Tween20 era seletivo para micro-organismos lipolíticos. Estes micro-organismos foram isolados em meio mineral contendo Tween20 e a ausência de zonas de hidrólise nos ensaios de atividade pode estar relacionada com o meio utilizado nestes ensaios, o Ágar Marinho. Este meio, ao contrário do meio utilizado no isolamento, apresenta composição complexa, incluindo a presença de outras fontes de carbono como

peptona e extrato de levedura. Nos organismos obtidos por enriquecimento, estas outras fontes de carbono podem ter reprimido a produção das enzimas lipolíticas (Boetius & Lochte, 1994), resultando na ausência de zonas de hidrólise. Isto apresenta relevância para a indústria de enzimas, uma vez que os meios de cultura utilizados na produção destas moléculas e de outros produtos são geralmente complexos e constituídos por substratos como o melado de cana (Harvey & McNeil, 2008). É de interesse que os organismos produtores de enzimas não sejam suscetíveis a processos de repressão enzimática, o que dificultaria a produção industrial destas moléculas. Portanto, isto permitiu inferir que o isolamento direto em meio sólido é preferível ao enriquecimento na bioprospecção de micro-organismos lipolíticos.

A atividade hidrolítica também foi maior entre os micro-organismos obtidos pela inoculação direta em Ágar Marinho contendo um substrato lipídico, sem enriquecimento prévio (Figura 3). A presença deste substrato, como esperado, favoreceu os organismos capazes de hidrolisá-lo, e esta parece ser a melhor estratégia para a prospecção de bactérias com atividade lipolítica.

Neste trabalho não foi observada variação vertical no ambiente pelágico, em relação aos micro-organismos com atividade lipolítica (Figura 4). Isto está de acordo com os resultados de Tamburini e colaboradores (2002) que também não observaram variações verticais na atividade hidrolítica *in situ*, quando os valores integrados para cada massa de água foram avaliados.

O lipídeo Tween80 foi utilizado por um menor número de micro-organismos. Isto pode estar relacionado com a presença de uma insaturação nesta molécula. A degradação de hidrocarbonetos insaturados em geral envolve a epoxidação e depois hidrólise (Neilson & Allard, 2008). Estas reações

requerem enzimas específicas, que provavelmente não são produzidas pelos micro-organismos estudados neste trabalho. Em suporte a esta hipótese, a capacidade de utilizar compostos insaturados foi relatada em *Marinobacter* (Neilson & Allard, 2008), e a produção da enzima epóxido hidrolase foi estudada em uma bactéria do gênero *Erythrobacter* (Woo et al., 2007). Neste trabalho, organismos destes dois gêneros estiveram entre os que apresentaram atividade hidrolítica sobre Tween80.

As classes bacterianas que apresentaram uma maior porcentagem de micro-organismos com atividade lipolítica foram Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacilli. Outros trabalhos também relataram que micro-organismos destas classes são comumente lipolíticos (Xiang et al., 2004; Dang et al., 2009; Yu et al., 2009). As classes Actinobacteria e Flavobacteriia foram as que apresentaram uma menor porcentagem de micro-organismos com atividade lipolítica. Os resultados de outros pesquisadores divergem em relação com a atividade lipolítica de micro-organismos da classe Actinobacteria. Panchagnula e Terli (2011) relataram que 38 de 88 linhagens (43,2%) da classe Actinobacteria apresentaram atividade lipolítica, sendo este valor similar ao obtido no presente estudo (29 a 43%). Kobayashi e colaboradores (2008), por outro lado, relataram que um dos gêneros de Actinobacteria, *Aeromicrobium*, estava entre os principais micro-organismos lipolíticos de sedimentos marinhos de subsuperfície. Porém o gênero *Aeromicrobium* não está representado na coleção de bactérias do presente estudo, o que explicaria a diferença nos resultados.

A menor porcentagem de linhagens lipolíticas entre os organismos da classe Flavobacteriia foi inesperada, uma vez que estes micro-organismos estão

normalmente entre os principais responsáveis pela degradação de moléculas complexas nos ecossistemas aquáticos (O'Sullivan et al., 2006). Porém este resultado pode ser um reflexo do baixo número de isolados obtidos (n = 5), e/ou alguma característica das linhagens estudadas.

Vários gêneros apresentaram micro-organismos que hidrolisaram os quatro lipídeos testados. *Pseudoalteromonas*, por exemplo, é comumente relatado entre os micro-organismos com alta atividade hidrolítica, incluindo lipolítica (Yu et al., 2009). Ivanova e colaboradores (2003) estudaram vários micro-organismos deste gênero e sugeriram que a atividade hidrolítica de diferentes linhagens de *Pseudoalteromonas* pode ser um reflexo dos habitats ocupados por estas linhagens.

Por outro lado, alguns micro-organismos não hidrolisaram nenhum dos lipídeos testados. Em alguns casos isso foi inesperado. Um exemplo disto é o resultado obtido para as três linhagens estudadas de *Zunongwangia profunda* (classe Flavobacteriia), uma vez que elevada atividade hidrolítica foi relatada para esta espécie, incluindo a capacidade de hidrolisar os substratos Tween20, 40 e 80 (Qin et al., 2007). Este resultado pode ser devido à diferenças entre as linhagens em função de seus habitats, como sugerido para *Pseudoalteromonas*, uma vez que as linhagens estudadas neste trabalho foram provenientes de amostras de água, enquanto que as estudadas por Qin et al., (2007) foram obtidas de sedimentos.

Halomonas foi o gênero mais bem representado entre os micro-organismos estudados, com dois taxa apresentando hidrólise sobre todos os lipídeos testados. A atividade hidrolítica de várias linhagens de *Halomonas* foi relatada anteriormente (Sánchez-Porro et al., 2003; Dang et al., 2009), porém os dados

são escassos para a espécie *H. sulfidaeris*, que se destacou por hidrolisar todos os lipídeos estudados. Na descrição original da espécie, Kaye e colaboradores (2004) relataram que *H. sulfidaeris* não hidrolisa o Tween80, não fornecendo informações sobre os outros lipídeos. Isto difere dos resultados obtidos neste estudo, e isto pode novamente ser um reflexo das diferenças entre os ambientes de origem da linhagem utilizada para descrever a espécie (fontes hidrotermais submarinas) e dos micro-organismos estudados neste trabalho.

O gênero *Bacillus* foi o segundo gênero mais bem representado na coleção estudada de micro-organismos. Além disso, várias linhagens de *Bacillus* apresentaram alta capacidade hidrolítica, o que é esperado, uma vez que os micro-organismos deste gênero estão entre os dominantes no uso industrial (Satyanarayana et al., 2012) e várias linhagens marinhas de *Bacillus* já foram relatadas como produtoras de enzimas lipolíticas (Karpushova, et al., 2005; Zhang et al., 2009)

Alguns micro-organismos se destacaram por apresentar altos índices enzimáticos sobre lipídeos. Entre as linhagens obtidas por enriquecimento, duas estiveram entre as que apresentaram os maiores índices enzimáticos, o que justificaria a prospecção de micro-organismos lipolíticos por este método. Entre os micro-organismos identificados, *Erythrobacter* e *Alteromonas* se destacaram. O gênero *Erythrobacter* inclui bactérias que produzem bacterioclorofila-a, mas que não conseguem viver exclusivamente de metabolismo fotossintético (Koblížek et al., 2003). Este aspecto da biologia deste gênero tem sido o mais estudado, sendo escassas as informações sobre a produção de enzimas hidrolíticas. Rathgeber et al. (2008) relataram a

hidrólise de Tween60 por uma linhagem nova de *Erythrobacter*, e *E. flavus*, uma das espécies identificadas no presente estudo, é capaz de hidrolisar o Tween80 (Yoon et al., 2003). Considerando a escassez de informações e os altos índices apresentados, estas linhagens de *Erythrobacter* merecem novos estudos mais aprofundados e parecem promissoras para a obtenção de enzimas com novas características.

Alteromonas macleodii também se destacou em relação aos seus índices de atividade lipolítica. Isto não é inesperado, uma vez que este micro-organismo tem sido caracterizado pela absorção de uma grande variedade de substratos e por sua importância em partículas em suspensão (Acinas et al., 1999). Além disso, Vandecandelaere et al. (2008) relataram a hidrólise do Tween80 por *A. macleodii*.

Uma pequena parte (3,6%) dos micro-organismos testados apresentou atividade lipolítica a 5°C. Yu et al., (2009) relataram porcentagens mais altas, de 10 a 36%, porém estes pesquisadores trabalharam com bactérias isoladas do gelo marinho. Dois micro-organismos se destacaram pela atividade em baixas temperaturas, *S. maltophilia* LAMA 900 e *J. marina* LAMA 910. Ambas as espécies foram relatadas previamente como produtoras de lipase (Quan et al., 2008; Hasan-Beikdashti et al., 2012), porém não em baixas temperaturas. Enzimas adaptadas ao frio têm sido bastante visadas para a suplementação de detergentes (Ciemlijski et al., 2007), sendo os dois micro-organismos selecionados candidatos para a produção de lipases com esta aplicação.

Uma pequena porcentagem dos micro-organismos estudados apresentou atividade endoglicanolítica, estando este resultado de acordo com os obtidos por outros pesquisadores (Podgórskaa & Mudryk, 2003; Yu et al., 2009). A

espécie *B. stratosphericus* se destacou entre os micro-organismos com atividade endoglicanolítica, sendo que esta atividade foi relatada anteriormente para outra linhagem da espécie (Odisi et al., 2012) que teve seu genoma sequenciado (Lima et al., 2013) e no qual os genes relacionados com a capacidade celulolítica foram identificados. Exemplos de micro-organismos marinhos dos outros gêneros que apresentaram atividade celulolítica, *Pseudoalteromonas* e *Paenibacillus*, são também relatados por outros pesquisadores (Kobayashi et al., 2008; Fu et al., 2010).

O baixo número de linhagens obtidas que hidrolisaram CMC dificulta a comparação da atividade endoglicanolítica, de maneira similar a realizada com a atividade lipolítica. Entretanto algumas observações podem ser feitas. Primeiramente, todos os micro-organismos com atividade endoglicanolítica foram obtidos por inoculação direta em meio sólido, em Ágar Marinho não suplementado com CMC, mas é possível, também neste caso, que a produção de enzimas pelos outros micro-organismos tenha sofrido algum tipo de repressão, conforme discutido para as lipases. Além disso, apesar do número de micro-organismo endoglicanolíticos ter sido similar, em relação com as amostras de origem ($n = 4$ para água e $n = 6$ para sedimentos), estes organismos parecem ser mais amplamente difundidos nos sedimentos, uma vez que todos os isolados de água se originaram da mesma amostra. Portanto, as bactérias endoglucanolíticas de sedimentos parecem ser mais diversificadas, pois três táxons diferentes foram identificados, que também variaram na sua atividade lipolítica. Isto sugere que os sedimentos seriam locais mais apropriados para a prospecção de micro-organismos celulolíticos, como observado por Odisi et al. (2012)

Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer o capitão e a equipe do navio Antares da Marinha do Brasil pelo apoio durante o embarque. Nós somos também, gratos pelo Dr. José Angel Alvarez Perez, coordenador do projeto “Patterns and Processes of the Ecosystems of the Southern Mid-Atlantic” – Census of Marine Life (CoML), pelo suporte e aos biólogos Estácio Jussie Odisi e Felipe Araújo Teixeira Paulo pela coleta de amostras. Nós também agradecemos ao International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) e ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 577915/2008-8) pelo suporte financeiro.

Referências

- Acinas, S. G.; Antón, J. 7 Rodríguez-Valera, F. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean Waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2): 514–522.
- Arnosti, C. 2011. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 3: 401–425.
- Baumann, P.; Baumann, L.; Mandel, M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. *Journal of Bacteriology*, 107(1): 268-294.
- Boetius, A. & Lochte, K. 1994. Regulation of microbial enzymatic degradation of organic matter in deep-sea sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 104: 299-307.

Ciemlijski, H.; Biaikowska, A. M.; Diugoidcka, A.; Daroch, M.; Tkaczuk, K. L.; Kalinowska, H.; Kur, J. & Turkiewicz, M. 2007. A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromas* sp. strain 643A. *Arch. Microbiol.*, 188: 27–36.

Dang, H.; Zhu, H.; Wang, J. & Li, T. 2009. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 71–79.

Debashish, G.; Malay, S.; Barindra, S. & Joydeep, M. 2005. Marine enzymes. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 96: 189–218.

Fenchel, T.; King, G. M.; Blackburn, T. H. 2012. *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. 3^o Edição, Academic Press, Londres, 312p.

Fu, X.; Liu, P.; Lin, L.; Hong, Y.; Huang, X.; Meng, X. & Liu, Z. 2010. A novel endoglycanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 1627–1636.

Hankin, L. & Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607.

Harvey, L. M. & McNeil, L. 2008. The design and preparation of media for bioprocesses. In: McNeil, L. & Harvey, L. M. *Practical Fermentation Technology*, Chichester, John Wiley & Sons, p. 97-123.

Hasan, F.; Shah, A. A. & Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235–251.

Hasan-Beikdashtia, M.; Forootanfara, H.; Safiariana, M. S.; Amerib, A.; Ghahremanic, M. H.; Khoshayandd, M. R. & Faramarzia, M.A. 2012. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(5): 670–677.

Intriago, P. 2012. Marine microorganisms: perspectives for getting involved in cellulosic ethanol. *AMB Express*, 2: 46.

Ivanova, E. P.; Bakunina, I. Y.; Nedashkovskaya, O. I.; Gorshkova, N. M.; Alexeeva, Y. V.; Zelepuga, E. A.; Zvaygintseva, T. N.; Nicolau, D. V. & Mikhailov, V. V. 2003. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens*. *Current Microbiology*, 46: 6–10.

Karpushova, A.; Brümmer, F.; Barth, S.; Lange, S. & Schmid, R. D. 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 59–69.

Karpushova, A.; Brümmer, F.; Barth, S.; Lange, S. & Schmid, R. D. 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 59–69.

Kaye, J. Z.; Márquez, M. C.; Ventosa, A. & Baross, J. A. 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 499–511.

Kluepfel, D. 1988. Screening of prokaryotes for cellulose- and hemicelluloses-degrading enzymes. *Methods in Enzymology*, 160: 180-186.

Kobayashi, T.; Koide, O.; Mori, K.; Shimamura, S.; Matsuura, T.; Miura, T.; Takaki, Y.; Morono, Y.; Nunoura, T.; Imachi, H.; Inagaki, F.; Takai, K. & Horikoshi, K. 2008. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor

aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles*, 12: 519–527.

Koblížek, M.; Bějá, O.; Bidigare, R. R.; Christensen, S.; Benitez-Nelson, B.; Vetriani, C.; Kolber, M. K.; Falkowski, P. G. & Kolber, Z. S. 2003. Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch. Microbiol.*, 180(5): 327-338.

Lima, A. O.; Cabral, A.; Andreote, F. D.; Cavalett, A.; Pessatti, M. L.; Dini-Andreote, F. & da Silva, M. A. 2013. Draft Genome Sequence of *Bacillus stratosphericus* LAMA 585, Isolated from the Atlantic Deep Sea. *Genome Announc.*, 1(3): 1-2.

Lotti, M. & Alberghina, L. 2007. Lipases: molecular structure and function. In: Polaina, J. & McCabe, A. P. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, 263-282.

McCarthy, M.; Hedges, J. & Benner, R. 1996. Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Marine Chemistry*, 55; 281-297.

Neilson, A.H. & Allard, A.S. (2008). *Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals*. Boca Raton: CRC Press, 710p.

Nerurkar, M.; Joshi, M.; Pariti, S. & Adivarekar, R. 2013. Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *J Surfact Deterg*, DOI 10.1007/s11743-012-1434-0.

Odisi, E. J.; Silvestrin, M. B.; Takahashi, R. Y. U; Silva, M. A. C. & Lima, A. O. S. 2012. Bioprospection of cellulolytic and lipolytic South Atlantic deep-sea bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol15-issue5-fulltext-17.

Orcutt, B. N.; Sylvan, J. B.; Knab, N. J. & Edwards, K. J. 2011. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2): 361-422.

O'Sullivan, L. A.; Rinna, J.; Humphreys, G.; Weightman, A. J. & Fry, J. C. 2006. Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 169–180.

Panchagnula, B. & Terli, R. 2011. Screening of marine sediments from Bay of Bengal near Pudimadaka coast of Andhra Pradesh for isolation of lipolytic Actinobacteria and characterization of the most potent isolates. *International Journal of Biology*, 3(1): 33-43.

Podgórskaa, B. & Mudryk, Z. J. 2003. Distribution and enzymatic activity of heterotrophic bacteria decomposing selected macromolecular compounds in a Baltic Sea sandy beach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56: 539–546.

Qin, Q. L.; Zhao, D. L.; Wang, J.; Chen, X. L.; Dang, H. Y.; Li, T. G.; Zhang, Y. Z. & Gao, P. J. 2007. *Wangia profunda* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from southern Okinawa Trough deep-sea sediment. *FEMS Microbiol. Lett.*, 271: 53–58.

Quan, Z. X.; Xiao, Y. P.; Roh, S. W.; Nam, Y. D.; Chang, H. W.; Shin, K. S.; Rhee, S. K.; Park, Y. H. & Bae, J. W. 2008. *Joostella marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from the East Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1388–1392.

- Rathgeber, C.; Lince, M. T.; Alric, J.; Lang, A. S.; Humphrey, E.; Blankenship, R. E.; Verméglio, A.; Plumley, F. G.; Van Dover, C. L.; Beatty, J. T. & Yurkov, V. 2008. Vertical distribution and characterization of aerobic phototrophic bacteria at the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Photosynth Res.*, 97(3): 235-244.
- Repeta, D. J.; Quan, T. M.; Aluwihare, L. I. & Accardi, A. 2002. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(6): 955–962.
- Sánchez-Porro, C.; Martín, S.; Mellado, E. & Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 295–300.
- Satyanarayana, T.; Sharma, A.; Mehta, D.; Puri, A. K.; Kumar, V.; Nisha, M. & Joshi, S. 2012. Biotechnological applications of biocatalysts from the Firmicutes *Bacillus* and *Geobacillus* species. In: Satyanarayana, T.; Johri, B. N. & Prakash, A. (eds.) *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, New York, Springer, p. 343-379.
- Silva, M. A. C.; Cavalett, A.; Spinner, A.; Rosa, D. C.; Jasper, R. B.; Quecine, M. C.; Bonatelli, M. L.; Pizzirani-Kleiner, A.; Corção, G. & Lima, A. O. S. 2013. Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. *SpringerPlus*, 2: 127-137.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A. & Krieg, N.R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, D. C., American Society for Microbiology. p. 607-654.

- Tamburini, C.; Garcin, J.; Ragot, M. & Bianchi, A. 2002. Biopolymer hydrolysis and bacterial production under ambient hydrostatic pressure through a 2000 m water column in the NW Mediterranean. *Deep-Sea Research II*, 49(11): 2109-2123.
- Tan, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L. & Wang, F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28: 628–634.
- Vandecandelaere, I.; Nercessian, O.; Segaert, E.; Achouak, W.; Mollica, A.; Faimali, M.; Vos, P. D. & Vandamme, P. 2008. *Alteromonas genovensis* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm and emended description of *Alteromonas macleodii* Baumann et al. 1972 (Approved Lists 1980). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2589–2596.
- Woo, J.H.; Hwang, Y.O.; Kang, S.G.; Lee, H.S.; Cho, J.C. & Kim, S.J. (2007). Cloning and characterization of three epoxide hydrolases from a marine bacterium, *Erythrobacter litoralis* HTCC2594. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 365–375.
- Xiang, Z.; Xiao, X.; Wang, P. & Wang, F. 2004. Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14(5): 952-958.
- Yoon, J. H.; Kim, H.; Kim, I. G.; Kang, K. H. & Park, Y. H. 2003. *Erythrobacter flavus* sp. nov., a slight halophile from the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1169–1174.
- Yu, Y.; Li, H.; Zeng, Y. & Chen, B. 2009. Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. *Polar Biol.*, 32: 1539–1547.
- Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Pearson, 2009.

Zhang, H.; Zhang, F. & Li, Z. 2009. Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 1267–1274.

Tabela 1. Número total de linhagens (N) e número de linhagens que apresentaram atividade hidrolítica sobre cada um dos quatro lipídeos testados, para cada gênero bacteriano estudado.

Gênero	N	Tween20	Tween40	Tween60	Tween80
<i>Alteromonas</i>	7	7	7	7	6
<i>Bacillus</i>	22	20	17	17	11
<i>Brevibacillus</i>	1	0	0	0	0
<i>Brevibacterium</i>	2	1	1	0	1
<i>Cobetia</i>	2	2	1	2	0
<i>Erythrobacter</i>	5	4	5	5	5
<i>Halomonas</i>	34	15	10	17	4
<i>Henriciella</i>	1	1	1	1	1
<i>Idiomarina</i>	6	6	5	6	5
<i>Joostella</i>	2	2	2	2	1
<i>Kytococcus</i>	1	0	0	0	0
<i>Marinobacter</i>	2	2	2	2	2
<i>Micrococcus</i>	2	2	1	2	2
<i>Nesterenkonia</i>	2	0	0	0	0
<i>Oceanobacillus</i>	3	1	1	1	1
<i>Paenibacillus</i>	1	1	1	1	0
<i>Paracoccus</i>	3	0	2	3	0
<i>Planomicrobium</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudoalteromonas</i>	4	4	4	4	4
<i>Psychrobacter</i>	6	6	6	6	0
<i>Salinicola</i>	6	5	6	6	0
<i>Sporosarcina</i>	1	1	1	1	0
<i>Staphylococcus</i>	8	6	6	7	4
<i>Stenotrophomonas</i>	1	1	1	1	1
<i>Sulfitobacter</i>	2	1	1	1	0
<i>Terribacillus</i>	2	1	0	0	0
<i>Vibrio</i>	1	0	0	0	0
<i>Zunongwangia</i>	3	0	0	0	0

Tabela 2. Número total de linhagens (N) e linhagens que apresentaram atividade hidrolítica sobre cada um dos quatro lipídeos testados, para cada espécie dos gêneros *Bacillus* e *Halomonas*.

Espécie	N	Tween20	Tween40	Tween60	Tween80
<i>Bacillus stratosphericus</i>	9	9	8	8	4
<i>Bacillus lehensis</i>	2	2	2	2	2
<i>Bacillus patagoniensis</i>	2	1	1	1	1
<i>Bacillus pocheonensis</i>	2	1	1	1	0
<i>Bacillus</i> sp.	2	2	1	1	1
<i>Bacillus anthracis</i>	1	1	1	1	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	1	1
<i>Bacillus infantis</i>	1	1	0	0	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	1	1	1	1
<i>Halomonas boliviensis</i>	11	3	1	4	0
<i>Halomonas</i> sp.	8	5	3	3	2
<i>Halomonas sulfidaeris</i>	6	5	5	5	2
<i>Halomonas axialensis</i>	5	1	0	2	0
<i>Halomonas meridiana</i>	4	1	1	3	0

Tabela 3. Linhagens que se destacaram em relação aos seus índices enzimáticos sobre lipídeos, estação e profundidade de origem, e seus respectivos índices médios de atividade enzimática e desvios padrão. As linhagens identificadas foram obtidas por isolamento direto em meio sólido, enquanto que as duas não identificadas foram obtidas por enriquecimento com CMC. Todas as linhagens foram isoladas a partir de amostras de água.

Linhagens	Estação e Profundidade	Destaque	Índices Enzimáticos	
			Média	Desvio
<i>Erythrobacter citreus</i> LAMA 915	4, 3600m	Tween40	6,51	0,95
		Tween60	6,02	0,57
<i>Erythrobacter flavus</i> LAMA 944	11, 200m	Tween40	6,05	0,21
		Tween80	5,06	0,34
<i>Erythrobacter flavus</i> LAMA 955	14, Superfície	Tween20	7,67	0,76
		Tween60	5,90	0,10
<i>Alteromonas macleodii</i> LAMA 973 LAMA 1042	14, 50m	Tween40	6,41	0,42
	14, 50m	Tween20	13,07	3,49
		Tween80	8,22	0,38
LAMA 1043	14, 50m	Tween40	6,58	1,42
		Tween60	7,50	0,87

Tabela 4. Linhagens que apresentaram atividade celulolítica, amostra, estação e profundidade de origem, e seus respectivos índices médios de atividade enzimática e desvios padrão.

Linhagem	Amostra	Estação e Profundidade	Índices Enzimáticos	
			Média	Desvio
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0924	Água	6, 50m	8,48	2,37
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0927	Água	6, 50m	8,01	0,99
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0928	Água	6, 50m	7,98	0,50
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0930	Água	6, 50m	11,07	3,51
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0762	Sedimento	Superstation 10, 4400m	8,04	2,26
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0781	Sedimento	Geo-3, 5200m	6,19	2,46
<i>B. stratosphericus</i> LAMA 0892	Sedimento	Cape abyss ST, 1107m	8,76	0,30
<i>P. glucanolyticus</i> LAMA 0767	Sedimento	Geo-3, 5200m	9,59	2,17
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. LAMA 0784	Sedimento	Superstation 4, 1900m	2,76	1,20
LAMA 0670	Sedimento	Geo-5, 4750m	11,45	1,56

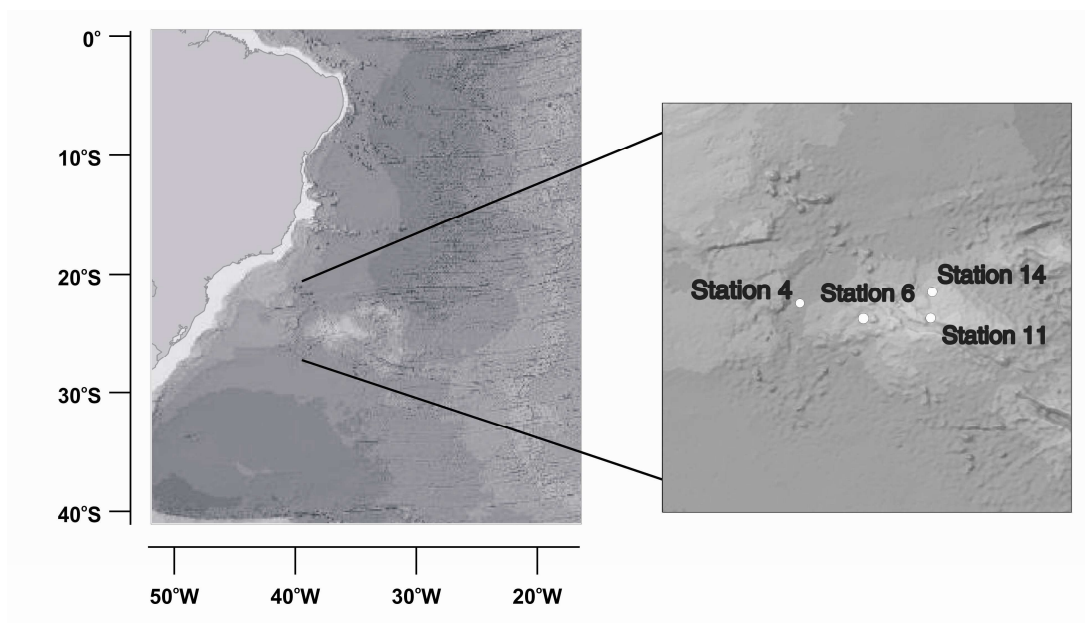


Figura 1. A Elevação do Rio Grande, com as quatro estações de coleta assinaladas.

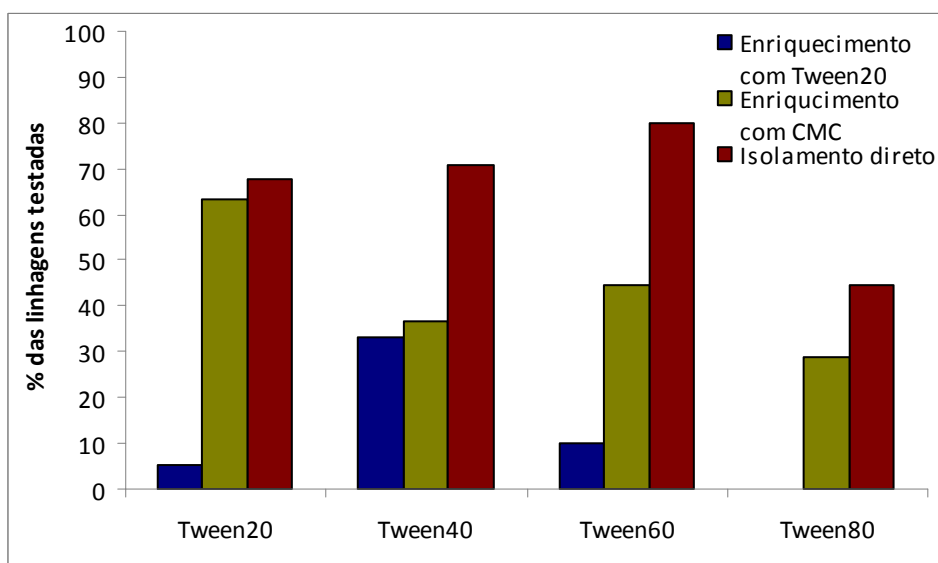


Figura 2. Porcentagem dos micro-organismos que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato lipídico, em cada tipo de enriquecimento realizado e entre as linhagens obtidas por isolamento direto em meio sólido. CMC, carboximetilcelulose.

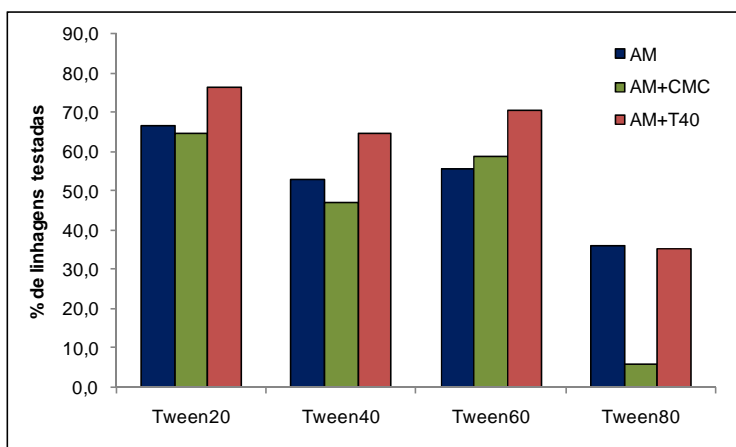


Figura 3. Porcentagem dos micro-organismos de sedimentos obtidos a partir dos três meios sólidos empregados que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato lipídico testado. AM, linhagens isoladas em Ágar Marinho; AM+CMC, linhagens isoladas em Ágar Marinho suplementado com CMC a 0,5%; AM+T40, linhagens isoladas em Ágar Marinho suplementado com Tween40 a 0,5%.

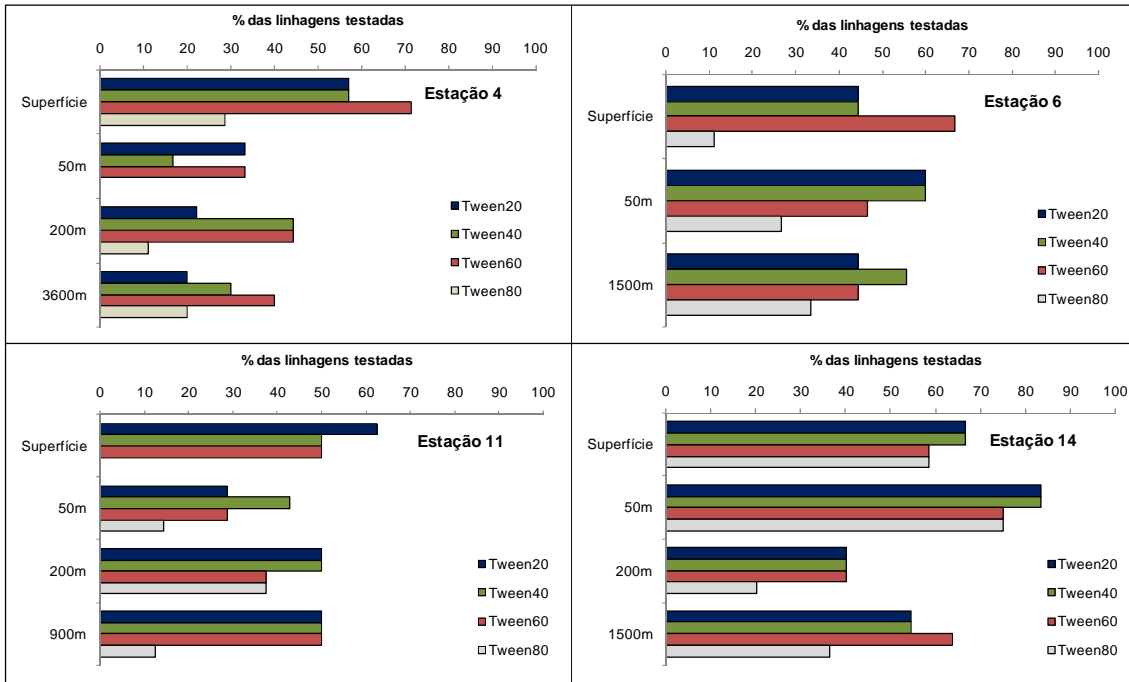


Figura 4. Porcentagem dos micro-organismos testados que apresentaram atividade hidrolítica, para cada substrato lipídico, para cada estação e profundidade amostrada. Na profundidade de 200m, estação 6, apenas um micro-organismo foi obtido, portanto não foi plotado no gráfico.

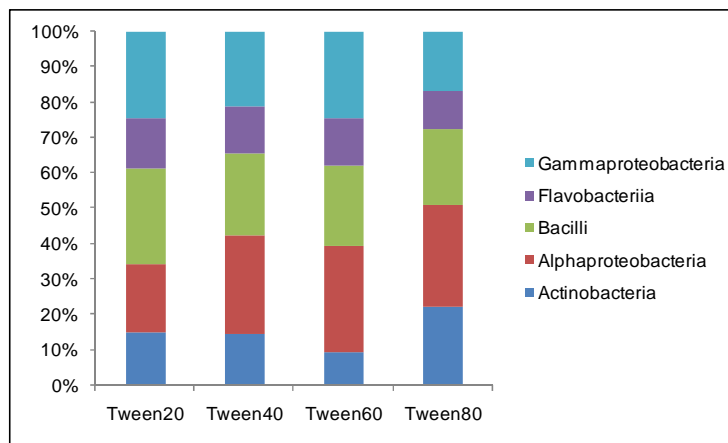


Figura 5. Distribuição da atividade hidrolítica das classes bacterianas identificadas sobre cada substrato lipídico.

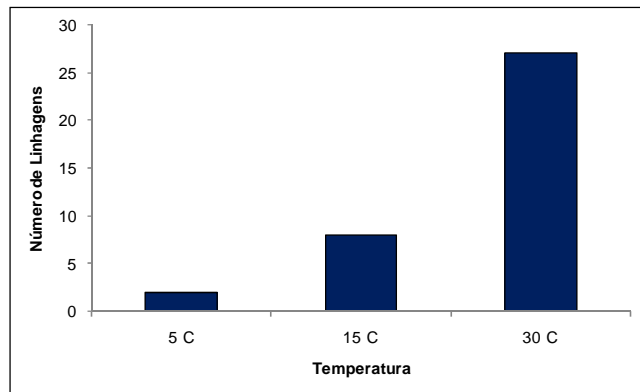


Figura 6. Número de linhagens que apresentaram atividade lipolítica para cada temperatura avaliada. A avaliação foi conduzida em placas de Ágar Marinho suplementado com Tween20 a 0,5%.

4. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho a riqueza de bactérias cultivadas foi estudada em amostras de água e sedimento coletas em duas regiões do Oceano Atlântico Sul. Um total de oito amostras de sedimento foi estudado, oriundas da parte leste do Atlântico Sul, principalmente das bacias abissais do Cabo e de Angola. Da região da Elevação do Rio Grande, 16 amostras de água foram estudadas, coletadas em quatro profundidades e em quatro estações diferentes. Destas vinte e quatro amostras, 138 bactérias foram isoladas por inoculação direta em Ágar Marinho, tendo sido identificadas pela análise de genes de RNA ribossômico 16S.

A coleção de bactérias identificadas englobou cinco classes bacterianas, de quatro filos distintos: Gammaproteobacteria (filo Proteobacteria, n = 71), Bacilli (filo Firmicutes, n = 41), Alphaproteobacteria (filo Proteobacteria, n = 11), Flavobacteriia (filo Bacteroidetes, n = 8) e Actinobacteria (filo Actinobacteria, n= 7) (Tabela 2). A dominância de Gammaproteobacteria entre as bactérias cultivadas está de acordo com estudos realizados por outros pesquisadores em diversas amostras marinhas, como, por exemplo, no plâncton e em moluscos (CAVALLO et al., 2009), em sedimentos marinhos do Mar Mediterrâneo (TAPILATU et al., 2010) e no nêuston (AZEVEDO et al., 2012).

Nas amostras de sedimentos apenas três classes de micro-organismos foram observadas (Gammaproteobacteria, Bacilli e Actinobacteria), enquanto que nas amostras de água as cinco classes foram detectadas (Figura 3). Esta menor diversidade em nível de classe nos sedimentos está de acordo com o resultado de outros autores. Tapilatu e colaboradores (2010), por

exemplo, isolaram micro-organismos de apenas duas classes bacterianas de sedimentos do Mediterrâneo, Gammaproteobacteria e Actinobacteria.

Tabela 2. Síntese dos resultados de diversidade de bactérias cultivadas. UTOs, Unidades Taxonômicas Operacionais.

Descritor	Sedimento	Água	Total
Amostras analisadas	8	16	24
Linhagens identificadas	70	68	138
Classe Actinobacteria	4	3	7
Classe Bacilli	27	14	41
Classe Gammaproteobacteria	39	32	71
Classe Alphaproteobacteria	0	11	11
Classe Flavobacteriia	0	8	8
UTOs	41	34	75
Linhagens de possíveis espécies novas	11	2	13

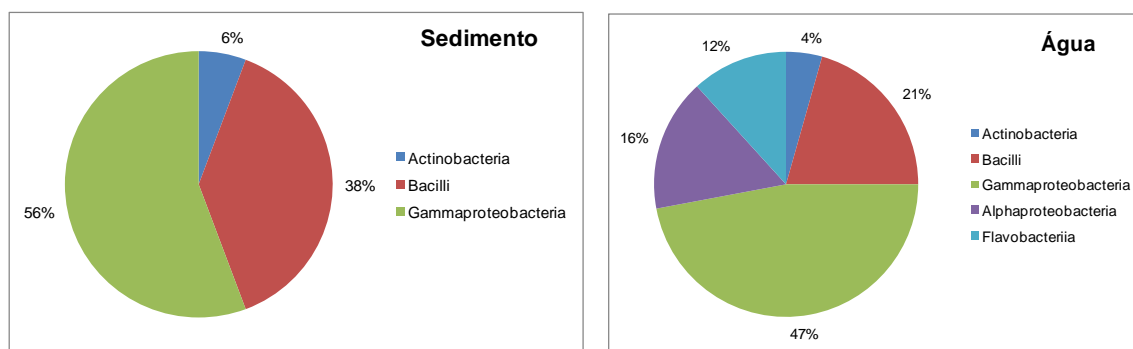


Figura 3. Distribuição das linhagens de sedimentos e água entre as classes de bactérias identificadas.

Uma das características dos sedimentos é a presença de uma maior diversidade de aceptores de elétrons que podem ser utilizados pelos micro-organismos. O oxigênio é o aceptor de elétrons preferencial, porém ele normalmente só está presente na superfície do sedimento, abaixo da qual outras moléculas se tornam importantes como o nitrato, o íon férrico e o sulfato (O'SULLIVAN et al., 2013). Como neste trabalho a metodologia adotada se

restringiu ao cultivo de organismos aeróbios, a diversidade em nível de classe de organismos cultivados foi provavelmente subestimada. Em sedimentos marinhos profundos vários organismos anaeróbios podem ser cultivados, incluindo bactérias do gênero *Clostridium* (Classe Clostridia) (LAURO et al., 2004) e redutoras do enxofre e do sulfato (Classe Deltaproteobacteria) (TAKAKI et al., 2010), por exemplo.

Os filos de bactérias Gram-positivas (Firmicutes e Actinobacteria) foram mais bem representados nas amostras de sedimento. Isso está de acordo com observações feitas por outros autores, que também relataram maior significância destes micro-organismos nestas amostras. Toffin et al., (2004) observaram que bactérias do filo Firmicutes compreenderam 50% dos micro-organismos detectados em culturas de enriquecimento de sedimentos marinhos profundos. Por outro lado, Gontang e colaboradores (2007), estudando micro-organismos Gram-positivos de sedimentos marinhos, observaram que a maioria das bactérias cultivadas (65,6%) pertencia ao filo Actinobacteria, sendo o restante (34,4%) do Filo Firmicutes. A dominância destes dois grupos também foi relatada em sedimentos do Mar Mediterrâneo por Gärtner et al. (2011).

Setenta e cinco UTOs foram identificadas entre os 138 micro-organismos identificados, sendo 41 UTOs provenientes de sedimentos e 34 de amostras de água. O número de UTOs relatadas em amostras de sedimentos e águas marinhas é bastante variável. Em geral as diferenças, quando os valores obtidos neste trabalho são comparados com os de outros autores, podem ser explicadas pelos seguintes fatos: (1) diferenças no número de bactérias isoladas e identificadas, (2) uso de diferentes meios de cultura para o

isolamento dos micro-organismos, e (3) o número de amostras analisadas. Gontang et al., (2007), por exemplo, identificaram 78 UTOs de bactérias dos filos de Gram-positivas (Firmicutes e Actinobacteria). Estes autores selecionaram 189 linhagens de 1624 bactérias, com base na morfologia da colônia, obtidas de onze meios de cultura e 225 amostras.

Somente três UTOs foram detectadas tanto nas amostras de água quanto nas de sedimento, duas do filo Firmicutes (relacionadas com as espécies *Bacillus stratosphericus* e *Staphylococcus saprophyticus* subs. *bovis*) e uma do filo Actinobacteria (relacionada com *Micrococcus luteus*). Isto sugere que as comunidades microbianas que habitam os sedimentos são distintas das que vivem no plâncton. Esta diferenciação pode ocorrer mesmo nos organismos detectados nos dois tipos de amostras. Rebollar et al. (2012), por exemplo, relatam a diferenciação das linhagens de *Exiguobacterium* oriundas de água e sedimentos, baseada na análise de quatro genes diferentes (citC, rpoB, recA e hsp70). Esta diferenciação de nichos foi relatada para vários outros micro-organismos marinhos incluindo *Alteromonas macleodii* (IVARS-MARTINEZ et al., 2008) e *Prochlorococcus marinus* (PARTENSKY; GARCZAREK, 2010). As linhagens relacionadas com a espécie *Bacillus stratosphericus*, obtidas neste trabalho, são boas candidatas a estudos de diferenciação de nichos e ecotipos, uma vez que foram bem representadas, tanto nas amostras de água como de sedimento. Porém, para isso seria importante o isolamento de um número maior de linhagens desta espécie.

Os micro-organismos identificados pertenciam a 30 gêneros de bactérias. Destes 30 gêneros, apenas oito foram detectados em ambos os tipos de amostras, sendo eles *Halomonas*, *Idiomarina*, *Pseudoalteromonas*,

Marinobacter, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium* e *Micrococcus*. Dezesete gêneros foram identificados entre os micro-organismos isolados de sedimentos, enquanto que vinte e um gêneros foram detectados nas amostras de água (Figura 4).

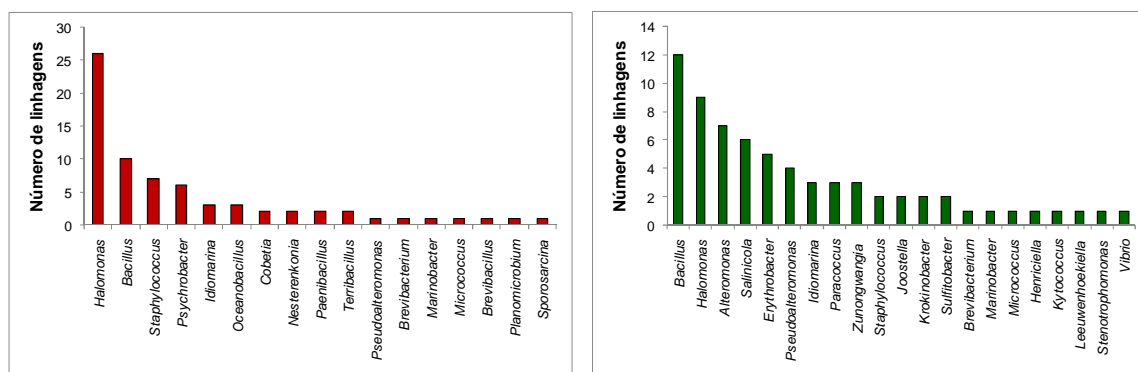


Figura 4. Número de linhagens para cada gênero de bactéria identificado nas amostras de sedimentos (esquerda) e água (direita).

Os gêneros identificados neste trabalho, tanto nas amostras de água quanto de sedimento, são em geral de organismos tipicamente marinhos ou comumente isolados de amostras marinhas, como *Halomonas* e *Bacillus* (GONTANG et al., 2007; ORCUTT et al., 2011). Além disso, muitos destes gêneros podem ser considerados típicos de ambientes marinhos profundos, *Idiomarina* e *Oceanobacillus*, tendo sido descritos de amostras de água batipelágica (IVANOVA et al., 2000), fontes hidrotermais (DONACHIE et al., 2003) e sedimentos marinhos (LU et al., 2011; KIM et al., 2007).

Dezoito linhagens pertencendo a possíveis novas espécies foram isoladas, sendo dezesseis de sedimentos e duas de amostras de água (Tabela 3). Estes organismos parecem estar relacionados com gêneros já descritos de bactérias.

Tabela 3. Linhagens identificadas que provavelmente pertencem a novas espécies, linhagem tipo mais similar, e porcentagem de similaridade, para cada tipo de amostra analisado e classe bacteriana identificada.

Código	Linhagem tipo mais similar e número de acesso (NCBI)	Similaridade
SEDIMENTO		
<i>Classe Actinobacteria, Filo Actinobacteria</i>		
LAMA 757	<i>Nesterenkonia halobia</i> DSM 20541 (NR_026197.1)	96%
<i>Classe Bacilli, Filo Firmicutes</i>		
LAMA 692	<i>Bacillus firmus</i> IAM 12464 (NR_025842.1)	94%
LAMA 690	<i>Bacillus pocheonensis</i> Gsoil 420 (NR_041377.1)	93%
LAMA 706	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831 (NR_028001.1)	93%
LAMA 766	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> DSM 5162 (NR_040883.1)	96%
LAMA 616	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i> CK27 (NR_037046.1)	96%
<i>Classe Gammaproteobacteria, Filo Proteobacteria</i>		
LAMA 645	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 (NR_029080.1)	95%
LAMA 796	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 (NR_029080.1)	93%
LAMA 837	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 (NR_029080.1)	96%
LAMA 642	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 (NR_029080.1)	94%
LAMA 638	<i>Halomonas sulfidaeris</i> Esulfide1 (NR_027185.1)	96%
LAMA 634	<i>Halomonas sulfidaeris</i> Esulfide1 (NR_027185.1)	94%
LAMA 683	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2-TR (NR_025119.1)	96%
LAMA 617	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2-TR (NR_025119.1)	93%
LAMA 624	<i>Psychrobacter aquaticus</i> CMS 56 (NR_042206.1)	96%
LAMA 723	<i>Psychrobacter namhaensis</i> SW-242 (NR_043141.1)	96%
ÁGUA		
<i>Classe Alphaproteobacteria, Filo Proteobacteria</i>		
LAMA 949	<i>Paracoccus homiensis</i> DD-R11 (NR_043733.1)	95%
LAMA 906	<i>Paracoccus versutus</i> ATCC 25364 (NR_042713.1)	95%

O padrão normalmente utilizado para inferir se um determinado organismo pertence ou não a uma nova espécie, com base na sequência do gene de RNA ribossômico 16S, é uma similaridade inferior a 97% com sequências de organismos já descritos. Este padrão não é livre de problemas e para refiná-lo, Stackbrandt e Ebers (2006) propuseram um limite de similaridade de 98,7% para este fim. Mesmo considerando este valor, existem organismos de espécies diferentes que apresentam sequências quase

similares no gene 16S. Um exemplo disto são os organismos que formam o grupo “*Bacillus cereus*”, que inclui ao menos seis espécies (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides* e *B. weistephaniensis*) indistinguíveis pela análise de genes ribossomais (PRIEST et al., 2004). Considerando estas informações é possível inferir que a coleção de bactérias identificadas possa incluir um número ainda maior de organismos pertencentes a novas espécies, do que foi já estabelecido.

De qualquer maneira, o isolamento destes micro-organismos novos não é de todo inesperado. Nos meses de abril e maio de 2013, por exemplo, foram publicadas as descrições de 33 novas espécies de bactérias marinhas em quatro periódicos associados à sistemática microbiana (Antonie van Leeuwenhoek, Current Microbiology, Systematic and Applied Microbiology e International Journal of Evolutionary and Systematic Microbiology). Além disso, outros autores também relataram o isolamento de linhagens pertencendo a novas espécies. Gärtner et al., (2011), por exemplo, relatam que 42% das UTOs identificadas em amostras de sedimentos do Mar Mediterrâneo pertenciam a espécies novas. Este maior número de linhagens novas pode estar relacionado com fato de estes autores terem adotado o valor de 98,7% da discriminação as UTOs, em comparação com o presente trabalho. Kobayashi et al. (2008) também relatam a ocorrência de espécies novas de sedimentos profundos, incluindo do gênero *Bacillus*.

Por outro lado, Blazina et al. (2009) não isolaram linhagens pertencendo a novas espécies, segundo o critério de 97% de similaridade, a partir de amostras de água. No presente trabalho, o número de linhagens novas de amostras de água também foi menor que o de sedimento, o que

sugere a existência de uma maior diversidade ainda a ser descoberta nos ambientes sedimentares, em comparação com os ambientes pelágicos.

Neste trabalho também foi estudada a atividade hidrolítica de linhagens marinhas isoladas sobre substratos lipídicos e sobre CMC. Foi observada que a atividade hidrolítica sobre lipídeos é comum entre os micro-organismos marinhos, enquanto que a atividade sobre CMC é bem mais restrita (Figura 5), em concordância com as observações de outros pesquisadores (PODGÓRSKAA; MUDRYK, 2003; YU et al., 2009).

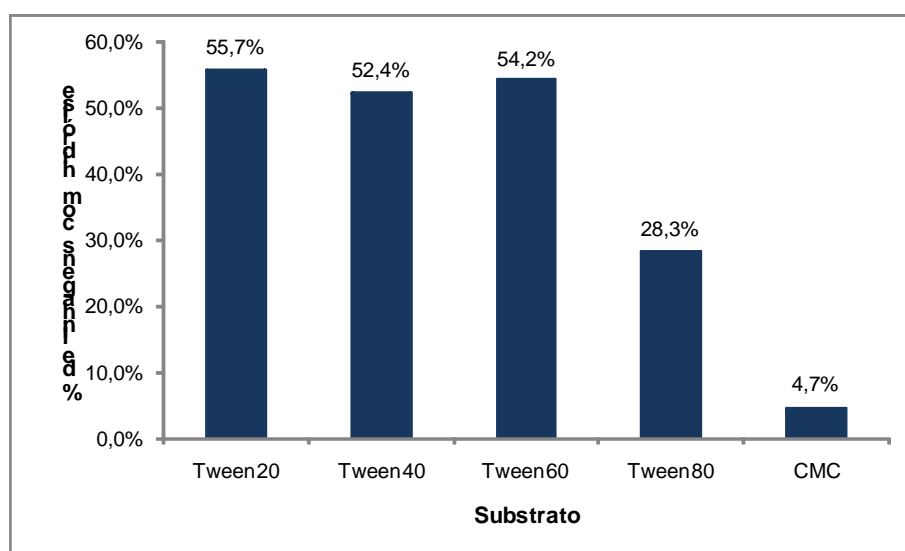


Figura 5. Porcentagem dos micro-organismos testados (n = 212) que apresentaram atividade hidrolítica para cada substrato avaliado, em ensaios em placas de Petri, conduzidos a 30°C.

Dos quatro substratos lipídicos testados, o Tween80 se destacou dos demais, pois uma menor porcentagem de micro-organismos foi capaz de hidrolisá-lo. Isto pode estar associado com a presença de uma ligação dupla na cadeia de carbonos deste lipídeo, o que tornaria sua hidrólise dependente da ação de enzimas mais específicas, não comumente produzidas pelas bactérias estudadas (NEILSON; ALLARD, 2008).

Entre os micro-organismos que apresentaram lipólise, alguns se destacaram por sua alta atividade, ou ainda pela atividade em baixas temperaturas (Tabela 4). Todos estes micro-organismos são candidatos a estudos futuros e apresentam o potencial para a produção mais rentável de enzimas lipolíticas, no caso das bactérias com alta atividade, ou na aplicação em processos que envolvem enzimas estáveis ao frio, como, por exemplo, na suplementação de detergentes (NERURKAR et al., 2013).

Tabela 4. Micro-organismos que se destacaram em relação a sua alta atividade hidrolítica ou pela atividade em baixas temperaturas, estação e profundidade de origem.

Linhagens	Estação	Profundidade	Atividade
<i>Erythrobacter citreus</i> LAMA 915	4	3600m	Tween40 e 60
<i>Erythrobacter flavus</i> LAMA 944	11	200m	Tween40 e 80
<i>Erythrobacter flavus</i> LAMA 955	14	Superfície	Tween20 e 60
<i>Alteromonas macleodii</i> LAMA 973	14	50m	Tween40
LAMA 1042	14	50m	Tween20 e 80
LAMA 1043	14	50m	Tween40 e 60
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LAMA 900	4	Superfície	Tween20 a 5°C
<i>Joostella marina</i> LAMA 910	4	200m	Tween20 a 5°C

Dos 131 micro-organismos identificados que foram avaliados quanto à atividade lipolítica, 31,3% (n = 41) hidrolisaram os quatro substratos lipídicos testados. Destes, 25,2% (n = 33) foram identificados em nível de espécie (Tabela 5). No total foram 22 espécies de bactérias que incluíram linhagens capazes de hidrolisar todos os lipídeos testados, sendo 9 da classe Gammaproteobacteria, 8 da classe Bacilli, 3 de Alphaproteobacteria e 1 espécie de cada uma das classes Flavobacteriia e Actinobacteria.

Tabela 5. Espécies de bactérias identificadas neste trabalho, que apresentaram hidrólise para todos os lipídeos testados, número de linhagens com atividade e classe taxonômica.

Espécie	Número de linhagens	Classe
<i>Alteromonas macleodii</i>	6	Gammaproteobacteria
<i>Bacillus firmus</i>	1	Bacilli
<i>Bacillus lehensis</i>	2	Bacilli
<i>Bacillus patagoniensis</i>	1	Bacilli
<i>Bacillus stratosphericus</i>	2	Bacilli
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	Bacilli
<i>Erythrobacter citreus</i>	2	Alphaproteobacteria
<i>Erythrobacter flavus</i>	2	Alphaproteobacteria
<i>Halomonas sulfidaeris</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Henriciella marina</i>	1	Alphaproteobacteria
<i>Idiomarina abyssalis</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Idiomarina loihiensis</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Idiomarina zobellii</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Joostella marina</i>	1	Flavobacteriia
<i>Marinobacter excellens</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Marinobacter flavimaris</i>	1	Gammaproteobacteria
<i>Micrococcus luteus</i>	1	Actinobacteria
<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	3	Gammaproteobacteria
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	1	Bacilli
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	1	Bacilli
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	Bacilli
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	Gammaproteobacteria

A versatilidade das linhagens pertencentes a estas 22 espécies identificadas é uma característica que as torna atrativas para o uso industrial. Uma possibilidade é a sua aplicação no tratamento de resíduos ricos em gorduras (MENDES; CASTRO, 2005), como os produzidos pela indústria pesqueira, por exemplo. Estes resíduos dificilmente apresentam apenas um tipo de lipídeo em sua composição, o que justificaria a utilização de micro-organismos mais versáteis em relação à atividade lipolítica. Atualmente nosso grupo de pesquisa está estudando dois destes micro-organismos mais detalhadamente, *Halomonas sulfidaeris* LAMA 838 e *Marinobacter excellens*

LAMA 842, em relação ao crescimento e a caracterização das enzimas em extratos brutos, quanto a atividade e estabilidade em diferentes temperaturas e valores de pH.

Os micro-organismos que apresentaram atividade sobre todos os substratos lipídicos podem produzir mais que uma lipase, ou então sua atividade múltipla pode estar associada com uma única enzima. Kim e colaboradores (2007), por exemplo, relataram que uma enzima produzida por *Yarrowia lipolytica* CL180 de origem marinha atuou sobre cinco lipídeos distintos. Karpushova et al. (2005), por outro lado, observaram a presença de duas enzimas em uma linhagem marinha do gênero *Bacillus*. Não é possível inferir se os isolados estudados na presente tese produzem uma ou mais enzimas, porém isto poderia ser verificado pela purificação e caracterização destas e pela identificação de genes que codificam estas proteínas, em estudos futuros.

Entre os dez micro-organismos nos quais foi observada a atividade endoglucanólítica, sete se destacaram pela sua relação com a espécie *B. stratosphericus*. O único outro relato de atividade endoglucanólítica para um organismo relacionado com *B. stratosphericus* foi feito pelo nosso grupo de pesquisa (ODISI et al., 2012). Além disso, em apenas outros dois taxa foi observada atividade endoglucanólítica. Estes resultados suportam as observações feitas por outros pesquisadores, que sugeriram que a produção de celulasas, em geral, é menos freqüente em micro-organismos marinhos.

Apesar da baixa porcentagem de micro-organismos marinhos com atividade endoglucanólítica, o estudo de enzimas celulolíticas nestes organismos tem se justificado, uma vez que proteínas com novas

características têm sido relatadas, especialmente em relação com a adaptação ao frio (GARSOUX et al., 2004; FU et al., 2010; TRIVEDI et al., 2011). Além disso, alguns micro-organismos marinhos têm sido notáveis pela capacidade de produzir múltiplas enzimas celulolíticas, assim como outras enzimas hidrolíticas, sendo a bactéria *Saccharophagus degradans* 2-40 um exemplo (WEINER et al., 2008).

5. CONCLUSÕES

Com este trabalho pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- ✓ Micro-organismos da classe Gammaproteobacteria (filó Proteobacteria) são dominantes nos sedimentos e nas amostras de água analisadas, e *Halomonas* e *Bacillus* foram os gêneros mais frequentes de bactérias cultiváveis. Além disso, as comunidades de bactérias das amostras de sedimentos apresentam uma maior fração de linhagens de possíveis espécies novas e maior riqueza de espécies, enquanto que as amostras de água apresentaram maior diversidade em nível de gênero e classe.
- ✓ As comunidades de bactérias cultiváveis não são distribuídas homogeneamente nos sedimentos e na coluna d'água dos locais estudados, sendo que as bactérias da classe Bacilli (filó Firmicutes) apresentam ampla ocorrência e incluem taxa que podem ter uma origem marinha e não marinha.
- ✓ Gammaproteobacteria esteve associada com águas mais salinas e quentes, enquanto Flavobacteriia e Actinobacteria apresentaram uma associação com águas mais ricas em nutrientes, clorofila e oxigênio.
- ✓ Os micro-organismos lipolíticos são igualmente distribuídos nos sedimentos e na água, sendo a atividade endoglucanólítica rara entre os micro-organismos marinhos, e restrita a poucas taxa das classes Bacilli e Gammaproteobacteria.

- ✓ O método de isolamento por inoculação direta em meio sólido contendo um substrato lipídico foi o melhor método para a obtenção de micro-organismos lipolíticos. As classes Actinobacteria (Filo Actinobacteria) e Flavobacteriia (Filo Bacteroidetes) apresentam menos organismos com capacidade lipolítica. Finalmente, a atividade lipolítica dos micro-organismos estudados é variável, sendo que a lipólise em baixas temperaturas é restrita a algumas linhagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACINAS, S. G.; ANTÓN, J.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 514–522, 1999.

AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Production of an endoglucanase by the shipworm bacterium, *Teredinibacter turnirae*. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 31, p. 41-47, 2002.

AMIN, S. A.; GREEN, D. H.; WAHEEB, D. A.; GÄRDES, A.; CARRANO, C. J. Iron transport in the genus *Marinobacter*. **Biometals**, v. 25, p. 135-147, 2012.

ANNAMALAI, N.; THAVASI, R.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 27, p. 2111–2115, 2011.

AST, J. C.; CLEENWERCK, I.; ENGELBEEN, K.; URBANCZYK, H.; THOMPSON, F. L.; VOS, P. D. DUNLAP, P. V. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2073–2078, 2007.

AZEVEDO, J. S. N.; RAMOS, I.; ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, C. S.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. S. Spatial and temporal analysis of estuarine bacterioneuston and bacterioplankton using culture-dependent and culture-independent methodologies. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 819–835, 2012.

BÉJA, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SUZUKI, M. T.; HADD, A.; NGUYEN, L. P.; JOVANOVIĆ, S. B.; GATES, C. M.; FELDMAN, R. A. SPUDICH, J. L.; SPUDICH, E. N.; DELONG, E. F. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. **Science**, v. 289, p. 1902–1906, 2000.

BELENEVA, I. A. Distribution and characteristics of *Bacillus* bacteria associated with hydrobionts and the waters of the Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 497–503, 2008.

BHATNAGARA, I.; KIM, S. K. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 631–643, 2012.

BLAŽINA, M.; NAJDEK, M.; FUKS, D.; RUSO, A.; ŠTIFANIĆ, M.; PAVLINIĆ, D. Characterisation and differentiation of oligotrophic waters by culturable particle-attached and free-living bacterial communities. **Ecological Indicators**, v. 9, n. 6, p. 1265–1270, 2009.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed. Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer, 2005.

BRINKHOFF, T.; GIEBEL, H. A.; SIMON, M. Diversity, ecology and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 531-539, 2008.

BRONNENMEIER, K.; KERN, A.; LIEBL, W.; STAUPENBAUER, W. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1395-1407, 1995.

BUCHAN, A.; GONZÁLEZ, J. M.; MORAN, M. A. Overview of the marine *Roseobacter* lineage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5665–5677, 2005.

CAVALLO, R. A. ACQUAVIVA, M. I.; STABILI, L. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). **Environ Monit Assess**, v. 149, p. 465–475, 2009.

CAVICCHIOLI, R.; OSTROWSKI, M.; FEGATELLA, F.; GOODCHILD, A.; GUIXA-BOIXEREU, N. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*). **Microbial Ecology**, v. 45, p. 203–217, 2003.

CIEMIJSKI, H.; BIAIKOWSKA, A. M.; DIUGOIDCKA, A.; DAROCH, M.; TKACZUK, K. L.; KALINOWSKA, H.; KUR, J.; TURKIEWICZ, M. A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromas* sp. strain 643A. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 27–36, 2007.

D'ONOFRIO, A.; CRAWFORD, J. M.; STEWART, E. J.; WITT, K.; GAVRISH, E.; EPSTEIN, S.; CLARDY, J.; LEWIS, K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 254–264, 2010.

DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 561–571, 2013.

DAY, T. Geography of the oceans. In: **Oceans**. New York: Chelsea House, 2006, p. 1-29.

DENNER, E. B. M.; VYBIRAL, D.; KOBLIZEK, M.; KAMPFER, P.; BUSSE, H. J.; VELIMIROV, B. *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellow pigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll a, isolated from the western Mediterranean Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1655–1661, 2002.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. A.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P. T.; S, A. L. B.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and

biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1305–1311, 2009.

DÍEZ-VIVES, C.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G. Evaluation of marine Bacteroidetes-specific primers for microbial diversity and dynamics studies. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 1047–1055, 2012.

DONACHIE, S. P., HOU, S., GREGORY, T. S., MALAHOFF, A.; ALAM, M. *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic γ -Proteobacterium from the Lō'ihi submarine volcano, Hawai'i. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1873–1879, 2003.

DONG, J.; HONG, Y.; SHAO, Z.; LIU, Z. Molecular cloning, purification, and characterization of a novel, acidic, pH-stable endoglucanase from *Marteella mediterranea*. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 393-398, 2010.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O.; GERDTS, G.; AMANN, R. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67 n. 11, p. 5134-5142, 2001.

ELLIOTT, G. M., BERNDT, C., PARSON, L. M. The SW African volcanic rifted margin and the initiation of the Walvis Ridge, South Atlantic. **Marine Geophysical Research**, v. 30, p. 207–214, 2009.

FRETTE, L.; JOHNSEN, K.; JØRGENSEN, N. O.; NYBROE, O.; KROER, N. Functional characteristics of culturable bacterioplankton from marine and estuarine environments. **International Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 219-227, 2004.

FRIEDLINE, C. J.; FRANKLIN, R. B.; MCCALLISTER, S. L.; RIVERA, M. C. Microbial community diversity of the eastern Atlantic Ocean reveals geographic differences. **Biogeosciences Discuss.**, v. 9, p. 109-150, 2012.

FU, X.; LIU, P.; LIN, L.; HONG, Y.; HUANG, X.; MENG, X.; LIU, Z. A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 160, p. 1627–1636, 2010.

FUHRMAN, J. A.; HAGSTRÖM, A. Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In: KIRCHMAN, D. L. **Microbial Ecology of the Oceans**. Washington D.C.: John Wiley & Sons, 2008. p. 45-90.

GAO, Z.; RUAN, L.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; XU, X. A novel salt-tolerant endo- β -1,4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1373–1382, 2010.

GARSOUX, G.; LAMOTTE, J.; GERDAY, C.; FELLER, G. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Biochemical Journal**, v. 384, p. 247-253, 2004.

GÄRTNER, A.; BLÜMEL, M.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Isolation and characterization of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, p. 421-435, 2011.

GILLIS, M.; VANDAMME, P.; VOS, P. D.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy. In. BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. New York: Springer, 2001, p. 43-48.

GIOVANNONI, S.; STINGL, U. The importance of culturing bacterioplankton on the 'omics' age. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 820-826, 2007.

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

GOODFELLOW, M.; STACH, J. E. M.; BROWN, R.; BONDA, A. N. V.; JONES, A. L.; MEXSON, J.; FIEDLER, H. P.; ZUCCHI, T. D.; BULL, A. T. *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 185–193, 2012.

GUERRERO-FERREIRA, R.; GORMAN, C.; CHAVEZ, A. A.; WILLIE, S.; NISHIGUCHI, M. K. Characterization of the bacterial diversity in Indo-West Pacific loliginid and sepiolid squid light organs. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 214–226, 2013.

HEKINIAN, R. Petrology of the Ninety East Ridge (Indian Ocean) compared to other aseismic ridges. **Contr. Mineral. and Petrol.**, v. 43, p. 125-147, 1974.

HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.D.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 211 – 219, 2006.

HOFFMANN, M.; FISCHER, M.; WHITTAKER, P. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. **Food Chemistry**, v. 122, p. 943–950, 2010.

HOU, S.; SAW, J. H.; LEE, K. S.; FREITAS, T. A.; BELISLE, C.; KAWARABAYASI, Y.; DONACHIE, S. P.; PIKINA, A.; GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; OMELCHENKO, M. V.; SOROKIN, A.; WOLF, Y. I. LI, Q. X., KEUM, Y. S.; CAMPBELL, S. Genome sequence of the deep-sea δ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. **PNAS**, v. 101, n. 52, p. 18036–18041, 2004.

HUANG, X.; SHAO, Z.; HONG, Y.; LIN, L.; LI, C.; HUANG, F.; WANG, H.; LIU, Z. Cel8H, a novel endoglucanase from the halophilic bacterium *Halomonas* sp.

S66-4: molecular cloning, heterogenous expression, and biochemical characterization. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 318-324, 2010.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Research in Microbiology**, v. 159 p. 495-506, 2008.

IVANOVA, E. P.; ROMANENKO, L. A.; CHUN, J.; MATTE, M. H.; MATTE, G. R.; MIKHAILOV, V. V.; SVETASHEV, V. I.; HUQ, A.; MAUGEL, T.; COLWELL, R. R. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 901–907, 2000.

IVARS-MARTINEZ, E.; MARTIN-CUADRADO, A. D'AURIA, G.; MIRA, A.; FERRIERA, S.; JOHNSON, J.; FRIEDMAN, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. **The ISME Journal**, v. 2, p. 1194–1212, 2008.

JEON, J. H.; KIM, J. T.; KIM, Y. J.; KIM, H. K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S. J.; LEE, S. H. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. **Applied and Microbiology Biotechnology**, DOI 10.1007/s00253-008-1656-2, 2008.

JONES, G. A. Advective transport of clay minerals in the region of the Rio Grande Rise. **Marine Geology**, v. 58, p. 187-212, 1984.

KARPUSHOVA, A.; BRÜMMER, F.; BARTH, S.; LANGE, S.; SCHMID, R. D. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 59–69, 2005.

KAYE, J. Z.; SYLVAN, J. B.; EDWARDS, K. J.; BAROSS, J. A. *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, subseafloor and deep-sea environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, p. 123–133, 2011.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria. Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses. New York: Springer, 2006, p. 3–37.

KIM, B.K.; LEE, B.H.; LEE, Y.J.; JIN, L.H.; CHUNG, C.H.; LEE, J.W. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 411–416, 2009.

KIM, H.J.; LEE, Y.J.; GAO, W.; CHUNG, C.H.; SON, C.W.; LEE, J.W. Statistical optimization of fermentation conditions and comparison of their influences on production of cellulases by a psychrophilic marine bacterium, *Psychrobacter*

aquimaris LBH-10 using orthogonal array method. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 542-548, 2011.

KIM, J. T.; KANG, S. G. WOO, J. H.; LEE, J. H.; JEONG, B. C.; KIM, S. J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, p. 820–828, 2007.

KOBAYASHI, H.; NOGI, Y.; HORIKOSHI, K. New violet 3,3 ϕ -bipyridyl pigment purified from deep-sea microorganism *Shewanella violacea* DSS12. **Extremophiles**, v. 11, p. 245–250, 2007.

KOBAYASHI, T.; KOIDE, O.; MORI, K.; SHIMAMURA, S.; MATSUURA, T.; MIURA, T.; TAKAKI, Y.; MORONO, Y.; NUNOURA, T.; IMACHI, H.; INAGAKI, F.; TAKAI, K.; HORIKOSHI, K. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. **Extremophiles**, v. 12, p. 519–527, 2008.

KRIEG, N. R. Identification of prokaryotes. In. BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. New York: Springer, 2001, p. 33-38.

KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed. Volume Four: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. New York: Springer, 2010.

KUMAR, N. Origin of “paired” assismic ridges: Ceará and Sierra Leone Rises in Equatorial Atlantic and Rio Grande Rise and Walvis Ridge in South Atlantic. **Marine Geology**, v. 30, n. 3-4, p. 175-191, 1979.

LAURO, F. M.; BERTOLONI, G.; OBRAZTSOVA, A.; KATO, C.; TEBO, B. M.; BARTLETT, D. H. Pressure effects on *Clostridium* strains isolated from a cold deep-sea environment. **Extremophiles**, v. 8, n. 2, p. 169-173, 2004.

LEE, F.; SHIN, N. R.; JUNG, M. J.; ROH, S. W.; KIM, M. S.; LEE, J. S.; LEE, K. C.; KIM, Y. O.; BAE, J. W. *Paenibacillus oceanisediminis* sp. nov. isolated from a marine sediment collected from the South Korean coast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, doi:10.1099/ijls.0.037085-0, 2012a.

LEE, H. S.; KWON, K. K.; KANG, S. G.; CHA, S. S.; KIM, S. J.; LEE, J. H. Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 353–357, 2010.

LEE, Y. J.; LEE, S. J.; JEONG, H.; KIM, H. J.; RYU, N.; KIM, B. C.; LEE, H. S.; LEE, D. W.; LEE, S. J. draft genome sequence of *Bacillus oceanisediminis* 2691. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6351–6352, 2012b.

- LEVIN, L. A.; GOODAY, A. J. The deep Atlantic Ocean. In: P.A. Tyler. **Ecosystems of the Deep Oceans**. Elsevier: Amsterdam, 2003. p. 39-79.
- LI, L. L.; MCCORKLE, S. R.; MONCHY, S.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 10, doi:10.1186/1754-6834-2-10, 2009.
- LI, X.; QIN, L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 539–543, 2005.
- LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J. MACCABE, A. P. (eds.) **Industrial Enzymes**, New York: Springer, 2007, p. 263–281.
- LU, X.; LIU, X.; LONG, C.; WANG, G.; GAO, Y.; LIU, J.; JIAO, B. A preliminary study of the microbial resources and their biological activities of the East China Sea. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- LÜCKERA, S.; WAGNERA, M.; MAIXNERA, F.; PELLETIERB, E.; KOCHA, H.; VACHERIE, B.; RATTEIE, T.; DAMSTÉF, J. S. S.; SPIECKG, E.; PASLIERB, D. L.; DAIMS, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **PNAS**, v. 107, n. 30, p. 13479–13484, 2010.
- MA, Y.; ZENG, Y.; JIAO, N.; SHI, Y.; HONG, N. Vertical distribution and phylogenetic composition of bacteria in the Eastern Tropical North Pacific Ocean. **Microbiological Research**, v. 164, p. 624-633, 2009.
- MATH, R. K.; JIN, H. M.; KIM, J. M.; HAHN, Y.; PARK, W.; MADSEN, E. L.; JEON, C. O. Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e35784. doi:10.1371/journal.pone.0035784, 2012.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 48, p. 135-142, 2005.
- MIKHAILOV, V. V.; ROMANENKO, L. A.; IVANOVA, E. P. The Genus *Alteromonas* and Related Proteobacteria. DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria. Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses. New York: Springer, 2006, p. 597–645.
- MOHRIAK, W. U.; NÓBREGA, M. ODEGARD, M. E.; GOMES, B. S.; DICKSON, W. G. Geological and geophysical interpretation of the Rio Grande Rise, south-eastern Brazilian margin: extensional tectonics and rifting of continental and oceanic crusts. **Petroleum Geoscience**, v. 16, p. 231–245, 2010.

MORRIS, R. M.; FRAZAR, C. D.; CARLSON, C. A. Basin-scale patterns in the abundance of SAR11 subclades, marine Actinobacteria (OM1), members of the *Roseobacter* clade and OCS116 in the South Atlantic. **Environmental Microbiology**, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02694.x, 2012.

NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S. **Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2008, 710p.

NERURKAR, M.; JOSHI, M.; PARITI, S.; ADIVAREKAR, R. Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. **J Surfact Deterg**, DOI 10.1007/s11743-012-1434-0, 2013.

NURACHMAN, Z.; KURNIASIH, S.D.; PUSPITAWATI, F.; HADI, S.; RADJASA, O.K.; NATALIA, D. Cloning of the endoglucanase gene from a *Bacillus amyloliquefaciens* PSM 3.1 in *Escherichia coli* revealed catalytic triad residues Thr-His-Glu. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2010.

O'SULLIVAN, L. A.; FULLER, K. E.; THOMAS, E. M.; TURLEY, C. M.; FRY, J. C.; WEIGHTMAN, A. J. Distribution and culturability of the uncultured 'AGG58' cluster of the Bacteroidetes phylum in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 359-370, 2004.

O'SULLIVAN, L. A.; SASS, A. M.; WEBSTER, G.; FRY, J. C.; PARKES, J.; WEIGHTMAN, A. J. Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. **FEMS Microbiology Ecology**, DOI: 10.1111/1574-6941.12106, 2013.

ODADA, E. O. Geochemistry of sediments from the Romanche Fracture Zone, Equatorial Atlantic. **Marine Geology**, v. 92, p. 291-312, 1990.

ODISI, E. J.; SILVESTRIN, M. B.; TAKAHASHI, R. Y. U; SILVA, M. A. C. & LIMA, A. O. S. Bioprospection of cellulolytic and lipolytic South Atlantic deep-sea bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, DOI: 10.2225/vol15-issue5-fulltext-17, 2012.

ORCUTT, B. N.; SYLVAN, J. B.; KNAB, N. J.; EDWARDS, K. J. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 361-422, 2011.

PARTENSKY, F.; GARCZAREK, L. *Prochlorococcus*: advantages and limits of minimalism. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, p. 305-331, 2010.

PETERMANN, H.; BLEIL, U. Detection of live magnetotactic bacteria in deep-sea sediments South Atlantic. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 117, p. 223-228, 1993.

PETTIT, R. K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 1-11, 2011.

PODGÓRSKAA, B.; MUDRYK, Z. J. Distribution and enzymatic activity of heterotrophic bacteria decomposing selected macromolecular compounds in a Baltic Sea sandy beach. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 56, p. 539–546, 2003.

PRICE, B. A.; KILLINGLEY, J. S.; BERGER, W. H. On the pteropod pavement of the eastern Rio Grande Rise. **Marine Geology**, v. 64, p. 217-235, 1985.

PRIEST, F. G.; BARKER, M.; BAILLIE, L. W.; HOLMES, E. C.; MAIDEN, M. C. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 23, p. 7959-7970, 2004.

PRIETO-DAVO, A.; VILLARREAL-GOMEZ, L. J.; FORSCHNER-DANCAUSE, S.; BULL, A. T.; STACH, J. E. M.; SMITH, D. C.; ROWLEY, D. C.; JENSEN, P. R. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84 p. 510–518, 2013.

QIN, G.; ZHU, L.; CHEN, X.; WANG, P. G.; ZHANG, Y. Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. **Microbiology**, v. 153, p. 1566–1572, 2007.

QIN, Q. L.; ZHANG, X. Y.; WANG, X. M.; LIU, G. M.; CHEN, X. L.; XIE, B. B.; DANG, H. Y.; ZHOU, B. C.; YU, J.; ZHANG, Y. Z. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. **BMC Genomics**, v. 11, p. 247-257, 2010.

QIN, Q. L.; ZHAO, D. L.; WANG, J.; CHEN, X. L.; DANG, H. Y.; LI, T. G.; ZHANG, Y. Z.; GAO, P. J. *Wangia profunda* gen.nov., sp.nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from southern Okinawa Trough deep-sea sediment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, p. 53–58, 2007.

RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 2103–2111, 2009.

REBOLLAR, E. A.; AVITIA, M.; EGUIARTE, L. E.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.; MORA, L.; BONILLA-ROSSO, G.; SOUZA, V. Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. **Environ. Microbiol.**, v. 14, n. 9, p. 2323-2333, 2012.

RYU, H. S.; KIM, H. K.; CHOI, W. C.; KIM, M. H.; PARK, S. Y.; HAN, N. S.; OH, T. K.; LEE, J. K. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 321–326, 2006.

SALEMA, A. Z. M.; GADOB, H. M.; COLOMBATTOC, D.; ELGHANDOUR, M. M. Y. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, no prelo, 2013.

SALTERS, V. J. M., SACHI-KOCHER, A. An ancient metasomatic source for the Walvis Ridge basalts. **Chemical Geology**, v. 273, p. 151–167, 2010.

SCHAUER, R.; BIENHOLD, C.; RAMETTE, A.; HARDER, J. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. **The ISME Journal**, v. 4, p. 159–170, 2010.

SCHUT, F.; DE VRIES, E. J.; GOTTSCHAL, J. C.; ROBERTSON, B. R.; HARDER, W.; PRINS, R. A.; BUTTON, D. K. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2150–2160, 1993.

SEO, H. J.; BAE, S. S.; LEE, J. H.; KIM, S. J. *Photobacterium frigidophilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1661–1666, 2005.

SHANMUGHAPRIYA, S.; KIRAN, G.S.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RANI, C. Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, n. 3, p. 625-640, 2010.

SIMS, D.; BRETTIN, T.; DETTER, J. C.; HAN, C.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; RIO, T. G. D.; NOLAN, M.; CHEN, F.; LUCAS, S.; TICE, H.; CHENG, J. F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; D'HAESELEER, P.; CHAIN, P.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; SCHNEIDER, S.; GÖKER, M.; PUKALL, R.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P. Complete genome sequence of *Kytococcus sedentarius* type strain (541T). **Standards in Genomic Science**, v. 1, p. 12-20, 2009.

SMEDILE, F.; MESSINA, E.; CONO, V. L.; TSOY, O.; MONTICELLI, L. S.; BORGHINI, M.; GIULIANO, L.; GOLYSHIN, P. N.; MUSHEGLAN, A.; YAKIMOV, M. M. Metagenomic analysis of hadopelagic microbial assemblages thriving at the deepest part of the Mediterranean Sea, Matapan-Vavilov Deep. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 167-182, 2013.

SOROKIN, D. Y. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. - a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation. **Microbiology**, v. 64, p. 295-305, 1995.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.

STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O.; SCHUMANN, P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 682-692, 1995.

TAKAKI, Y.; SHIMAMURA, S.; NAKAGAWA, S.; FUKUHARA, Y.; HORIKAWA, H.; ANKAI, A.; HARADA, T.; HOSOYAMA, A.; OGUCHI, A.; FUKUI, S.; FUJITA, N.; TAKAMI, H.; TAKAI, K. Bacterial lifestyle in a deep-sea hydrothermal vent chimney revealed by the genome sequence of the thermophilic bacterium *Deferribacter desulfuricans* SSM1. **DNA Research**, v. 17, p. 123–137, 2010.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628–634, 2010.

TANG, K.; HUANG, H.; JIAO, N.; WU, C. H. Phylogenomic analysis of marine roseobacters. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11604, 2010.

TAPILATU, Y.; ACQUAVIVA, M.; GUIGUE, C.; MIRALLES, G.; BERTRAND J.-C.; CUNY P. Isolation of alkane-degrading bacteria from deep-sea Mediterranean sediments. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50 p. 234–236, 2010.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 403–431, 2004.

TOFFIN, L.; WEBSTER, G.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C.; PRIEUR, D. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p. 357–367, 2004.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805–814, 2005.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 891–897, 2011.

VELMURUGAN, N.; KALPANA, S.; CHO, J. Y.; LEE, G. H.; PARK, S. H.; LEE, Y. S. Phylogenetic analysis of culturable marine bacteria in sediments from South Korean Yellow Sea. **Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 261–272, 2011.

WAGNER-DÖBLER, I.; BIEBL, H. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 60, p. 255–280, 2006.

WEINER, R. M.; TAYLOR, L. E.; HENRISSAT, B.; HAUSER, L.; LAND, M.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; SAUNDERS, E. H.; LONGMIRE, A. G.; ZHANG, H.; BAYER, E. A.; GILBERT, H. J.; LARIMER, F.; ZHULIN, I. B.; EKBORG, N. A.; LAMED, R.; RICHARDSON, P. M.; BOROVOK, I.; HUTCHESON, S. Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* Strain 2-40T. **PLoS Genet.**, v. 4, n. 5: e1000087. doi:10.1371/journal.pgen.1000087, 2008.

WILSON, D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 259–263, 2011.

XIE, B. B.; SHU, Y. L.; QIN, Q. L.; RONG, J. C.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; SHI, M.; HE, H. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, .Y Z. Genome sequences of type strains of seven species of the marine bacterium *Pseudoalteromonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2746–2747, 2012.

YOON, J. H.; LEE, K. C.; WEISS, N.; KHO, Y. H.; KANG, K. H.; PARK, Y. H. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1079-1086, 2001.

YOSHIZAWA, S.; KAWANABE, A.; ITO, H.; KANDORI H.; KOGURE, K. Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine Flavobacteria. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 1240–1248, 2012.

YOU, Z. Q.; LI, J.; QIN, S.; TIAN, X. P.; WANG, F. Z.; ZHANG, S.; LI, W. J. *Bacillus abyssalis* sp. nov., isolated from a sediment of the South China Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 963–969, 2013.

YU, Y.; LI, H.; ZENG, Y.; CHEN, B. Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. **Polar Biology**, v. 32, p. 1539–1547, 2009.

ZENG, Y.; ZOU, Y.; GREBMEIER, J. M.; HE, J.; ZHENG, T. Culture-independent and -dependent methods to investigate the diversity of planktonic bacteria in the northern Bering Sea. **Polar Biology**, v. 35, p. 117–129, 2012.

ZHANG, H.; MOON, Y.H; WATSON, B.J.; SUVOROV, M.; SANTOS, E.; SINNOTT, C.A.; HUTCHESON, S.W. Hydrolytic and phosphorolytic metabolism of cellobiose by the marine aerobic bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 1117–1125, 2011.

ZHANG, J. W.; ZENG, R. Y. Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 612–621, 2008.