novomar

New uses of the sea

Aplicación de Extractos y Compuestos Naturales Bioactivos de Origen Marino para la Erradicación del Biofouling

Nuno F. Azevedo
University of Porto
Faculty of Engineering

PROGRAMA COOPERACIÓN TRANSFRONTERIZA ESPAÑA ~ PORTUGAL COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRIÇA 2007 ~ 2013

Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Lepabe
Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy

Unión Europea
FEDER
Invertimos en su futuro

Porquê extratos e compostos naturais de origem marinha?

NPR

RSC Publishing

REVIEW

View Article Online

Marine natural products

Cite this: *Nat. Prod. Rep.*, 2013, **30**, 237

John W. Blunt,*[a] Brent R. Copp,[b] Robert A. Keyzers,[c] Murray H. G. Munro[a] and Michèle R. Prinsep[d]

Covering: 2011. Previous review: *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, 144–222.

This review covers the literature published in 2011 for marine natural products, with 870 citations (558 for the period January to December 2011) referring to compounds isolated from marine microorganisms and phytoplankton, green, brown and red algae, sponges, cnidarians, bryozoans, molluscs, tunicates, echinoderms, mangroves and other intertidal plants and microorganisms. The emphasis is on new compounds (1152 for 2011), together with the relevant biological activities, source organisms and country of origin. Biosynthetic studies, first syntheses, and syntheses that lead to the revision of structures or stereochemistries, have been included.

Received 14th November 2012

DOI: 10.1039/c2np20112g

echinoderms, mangroves and other intertidal plants and microorganisms. The emphasis is on new compounds (1152 for 2011), together with the relevant biological activities, source organisms and

De onde vem esses compostos e extratos?

Peixes

Algas

Fungos

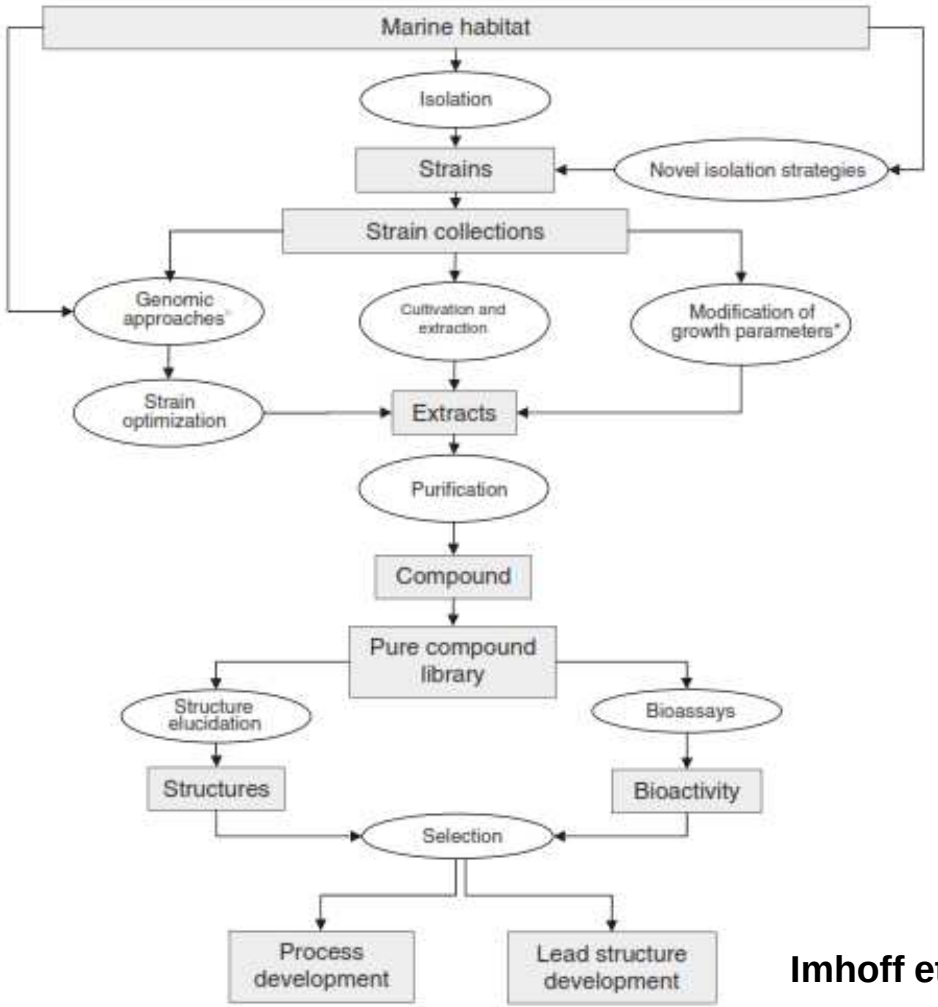
Bactérias

Esponjas

Cnidários

Moluscos

Diagrama de processo para a recolha de extratos e compostos de ambientes marinhos



Imhoff et al. Biotech Advan (2011)

Que tipos de biofilmes podem ser afetados?

BIOFILMES SIMPÁTICOS…

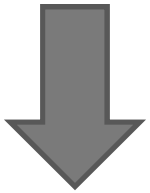
BIOFILMES INDESEJÁVEIS …

BIOFILMES PERIGOSOS …

BIOFILMES SIMPÁTICOS

- **Aplicação de compostos que condicionem superfícies e aumentem a adesão dos microrganismos.**

- **Utilização de compostos que sejam seletivamente consumidos por microrganismos benéficos em biofilmes.**



Não muito relevante até ao momento!

BIOFILMES INDESEJÁVEIS E PERIGOSOS

- **Aplicação de microrganismos marinhos para inibir a formação de biofilmes por parte de outros (micro)organismos.**

- **Utilização de compostos como agentes antimicrobianos em biofilmes (aplicados em suspensão ou na superfície).**

- **Aplicação de compostos que condicionem superfícies e diminuam a adesão dos microrganismos.**

BIOFILMES INDESEJÁVEIS

- **(Bio)fouling em cascos de navios ou submarinos.**

Table I. Antilarval compounds from marine bacteria.

Bacterium	Inhibits	Inhibitive compound	Reference
Alteromonas sp.	Attachment of *B. amphitrite*	Ubiquinone	Kon-ya et al. 1995
Acinetobacter sp.	Attachment of *B. amphitrite*	6-bromoindole-3-carbaldehyde	Olguin-Uribe et al. 1997
Pseudoalteromonas marina	Attachement of *B. amphitrite* and *Enteromorpha* sp.	Polar low molecular weight (>500 Da) heat stable compound	Holmstrøm et al. 1992; 1996; Egan et al. 2001
Pseudomonas citrea and *P. ulvae*	Settlement of *H. elegans* and *B. amphitrite*	Unknown	Holmstrøm et al. 2002
Pseudomonas sp.	Microbial fouling, attachment of algal spores and *B. amphitrite*	Phenazine-carboxylic acid; hydroxyphenazine; heptylquinol-one; nonylquinol-one; pyolipic	Burgess et al. 2003
Halomonas (Deleya) marina, *Vibrio campbelli*	Attachment of *B. amphitrite*	Unknown exopolysaccharides	Maki et al. 1988; 2000
Micrococcus sp., *Rhodovulum* sp. and *Vibrio* sp.	Attachment of *B. amphitrite*	Unknown extracellular polymers	Lau et al. 2003
Vibrio sp.	Attachment of *B. amphitrite*	Unknown	Mary et al. 1993
Vibrio alginolyticus	Attachment of *B. amphitrite*, *H. elegans*, and *B. neritina*	Heat stable, polar, high molecular weight (>200 kDa) carbohydrate	Dobretsov & Qian, 2002; Harder et al. 2004a
Vibrio sp. and an unidentified α-Proteobacterium	Settlement of *H. elegans* and *B. neritina*	Large (>100 kDa), polar, heat stable polysaccharides	Dobretsov & Qian, 2004

Dobretsov et al. Biofouling (2006)

BIOFILMES INDESEJÁVEIS

- **Conceito de “living paints”. Incorporação de microrganismos em tintas para inibir a adesão de macrorganismos.**

“A incorporação de *Pseudoalteromonas tunicata* em hidrogéis utilizados para revestir superfícies atrasou a adesão de cracas em cerca de 14 dias”

Holmstrom et al. FEMS Microbiol Ecol (2002)

BIOFILMES PERIGOSOS ...

- **Compostos isolados a partir de esponjas do mar (Porifera) demonstram alguma atividade antimicrobiana.**

Table 2. Antifungal activity of marine compounds.

Series no.	Name of the compounds	Antifungal activity (zone inhibition diameter)				
		Candida albicans	*Fusarium chlamydosporum*	*Rhizoctonia bataticola*	*Aspergillus niger*	*Alternaria alternata*
1	(*Z*)-5-(4-hydroxybenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione	-	-	-	-	-
2	17-*O*-methyllatrunculin	++	++	+	++	++
3	*N*-Acetyllatrunculin B	+	+	-	+	-
4	(1*S*,2*E*,4*S*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol	+	+	-	+	+
5	Sipholenone A	-	-	-	-	-
6	Manzamine A	++	++	+	+	+
7	(*Z*)-5 (4-trifluoromethylbenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione	-	-	-	-	-
8	*N*-Hydroxymethyllatrunculin B	-	-	-	-	-
9	Siphonellinol A	+	-	-	+	+
10	Verongiaquinol	+++	++	+	+++	++
11	(*Z*)-5-(4-ethylthiobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione	+	-	-	-	-
12	Sipholenol A	-	-	-	-	-
13	(1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol	++	++	+	++	++
14	Antibiotic control (nystatin 50 units/disc)	-	++	+++	++	++

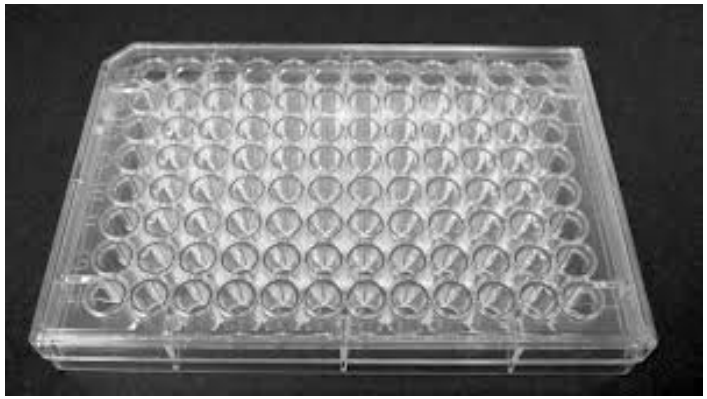
Activity key as zone inhibition size: -, no inhibition; 1+, ≤ 10 mm; 2+, 11–20 mm; 3+, 21–30 mm. Activity shown in the table is from three independent experiments.

Aqil et al. Drug Chem Toxicol (2011)

Como analizar o impacto dos compostos e extratos naturais marinhos em biofilmes?

- **Existem várias plataformas/equipamentos para formar biofilmes disponíveis – a decisão sobre qual deles usar depende do objetivo final do trabalho.**

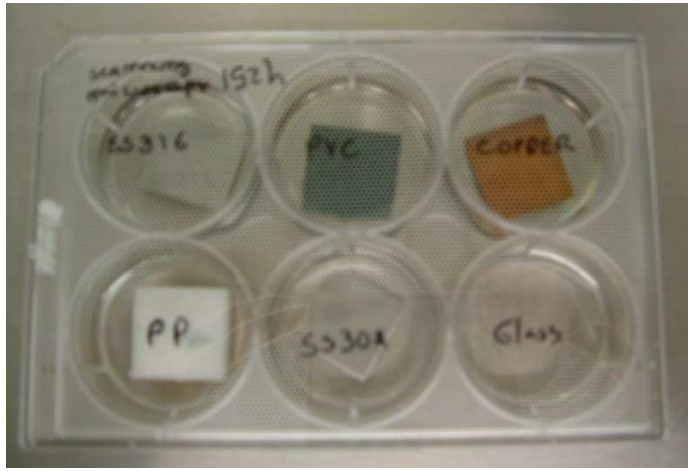
- **Placas de 96 poços**



- **Calgary device**

Como analizar o impacto dos compostos e extratos naturais marinhos em biofilmes?

- **Placas de 6 poços**



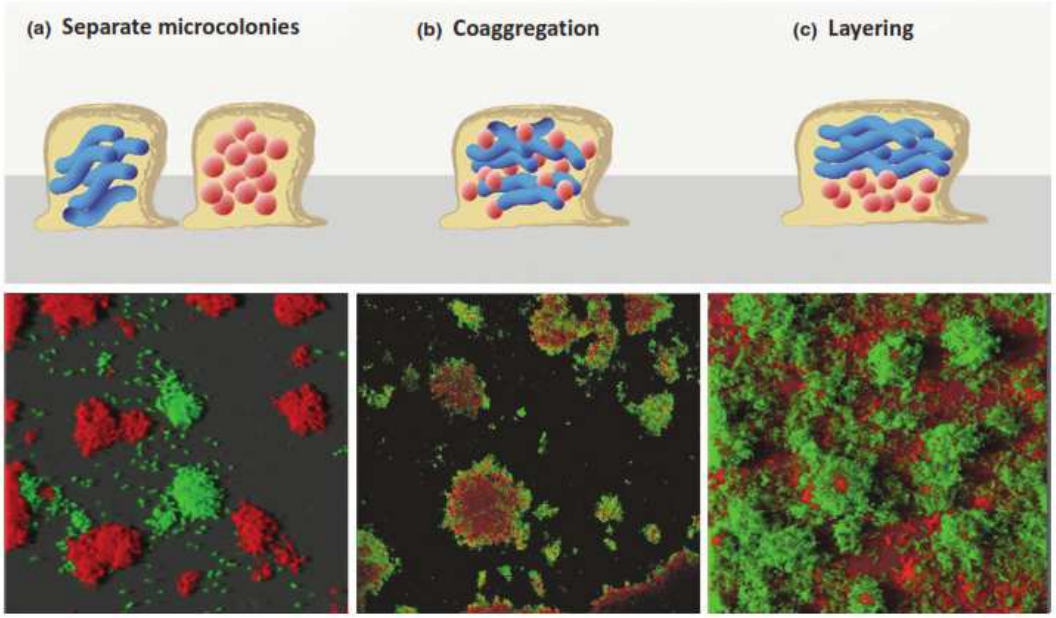
- **Células de fluxo**

Métodos para analisar biofilmes

High-throughput	Medium-throughput	Low-throughput
Cristal violeta	DAPI	Métodos de cultura
XTT	Syto9/PI	Microscopia
Resazurina	FISH/PNA-FISH	Determinação da biomassa
~ 10^3-10^4 data points	~ 10^2-10^3 data points	~ 10-10^2 data points

Efeito na ecologia dos biofilmes?

- Os organismos podem estabelecer um variado leque de interações biológicas:
  - Neutralismo
  - Competição
  - Antagonismo (e.g. predação)
  - Mutualismo



Elias & Banin, FEMS Micro Rev, 2012

biomode®
BIOMOLECULAR DETERMINATION

Spin-off que desenvolve métodos rápidos de diagnóstico para microorganismos baseados em PNA-FISH

Spinpark - Avepark
Zona industrial da Gandra
Guimarães

Financiada por capitais de risco (1.6m€) em 2014.

Laboratório totalmente equipado com aprox. 100 m^2.

http://www.biomode-sa.com/

novomar

New uses of the sea

http://novomar.cetmar.org/

- **ATIVIDADE 1. Aplicações**
  - **Tecnologias de controlo da formação de biofilmes**
  - **Sistemas anti-fungos**
- **ATIVIDADE 2. Consolidação do Centro Multipolar**
  - **Interação entre FEUP, UCP-Porto e CIIMAR nos estudos visando o desenvolvimento de sistemas anti-fungos**

novomar

New uses of the sea

BIOLOGICAL MODELS

Pseudoalteromonas tunicata (gently provided by Prof. Staffan Kjelleberg)

- Gram -
- primary colonizer
- prevents micro fouling but stimulates macro fouling

Bacillus cereus (from CIIMAR)

- Gram +
- Isolated from the gut of gastropods in the northern coast of Portugal

novomar

New uses of the sea

UCP – EXTRACT FROM THE SUPERNATANT OF A MICROALGAE CULTURE

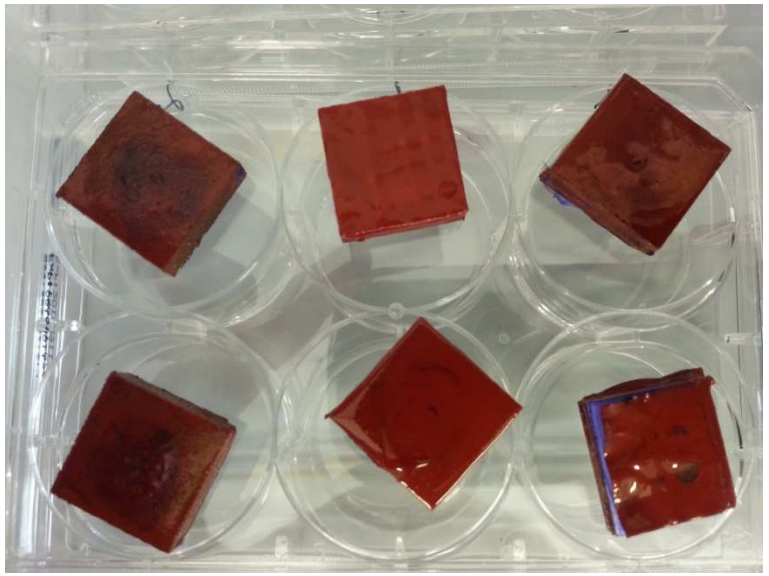
- Determine the effect on adhesion and biofilm development of *B. cereus* or *P. tunicata*
- Assays performed on 96-well plates
- Conditions tested:
  - Surface conditioning
  - Addition to the suspension

novomar

New uses of the sea

UNL - NEW FORMULATIONS OF PAINTS

INCORPORATION OF BIOCIDES IN PAINTS FOR BIOFOULING PREVENTION IN SHIPS



Mechanism of adhesion inhibition

Death
Cell viability
Quorum sensing
Surface chemistry
…

?

novomar

New uses of the sea

CIIMAR – EXTRACTS OF CYANOBACTERIA

IIM-CSIC: SUB-PRODUCTS FROM THE FISHING INDUSTRY

OBRIGADO PELA ATENÇÃO!