

ISABELLE RODRIGUES LOPES

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR BACTÉRIAS
ASSOCIADAS À ESPONJA MARINHA *Plakina cyanorosea* DO
LITORAL DE CABO FRIO (RJ)



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/ 2020

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Marinella Silva Laport e coorientação do Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira.

CIP - Catalogação na Publicação

RI74a Rodrigues Lopes, Isabelle
ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR BACTÉRIAS
ASSOCIADAS À ESPONJA MARINHA Plakina cyanorosea DO
LITORAL DE CABO FRIO (RJ) / Isabelle Rodrigues
Lopes. -- Rio de Janeiro, 2020.
126 f.

Orientadora: Marinella Silva Laport.
Coorientador: Bruno Francesco Rodrigues de
Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. comunidade bacteriana. 2. enzimas
microbianas. 3. potencial biotecnológico. 4.
Homoscleromorpha. 5. Pseudoalteromonas. I. Silva
Laport, Marinella, orient. II. Francesco Rodrigues
de Oliveira, Bruno , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Isabelle Rodrigues Lopes
DRE: 117153849

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
MSc. Athayde Neves Junior
MSc. Bárbara Ribeiro Gomes
Prof. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Título da Monografia: “Análise da Produção de Hidrolases por Bactérias associadas à Esponja Marinha *Plakina cyanorosea* do Litoral de Cabo Frio (RJ)”

Local: Sala virtual <https://join.skype.com/wfPwYXds4g0>.
Data e hora de início: 10 de dezembro de 2020 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
<u>10</u>	MSc. Athayde Neves Junior
<u>10</u>	MSc. Bárbara Ribeiro Gomes
<u> </u>	Prof. Mateus Gomes de Godoy

Presidente da banca Ana Maria M de Almeida
Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

Isabelle Rodrigues Lopes

Aluno: Isabelle Rodrigues Lopes

Marinella Silva Laport

Orientador: Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira
Profa. Marinella Silva Laport
(Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira – Coorientador)

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Coordenador de TCC Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

**Ao meu avô Nelson (*in memoriam*),
que sempre foi um grande amigo e me apoiou.
Hoje você continua presente comigo, no meu coração!**

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, que me concedeu uma família maravilhosa, amigos incríveis, saúde e capacidade para ir em busca dos meus sonhos. Que me permitiu chegar até aqui e sempre irá me amparar!

Aos meus pais, Ana Cláudia e Sávio, que com muito amor, carinho e dedicação sempre fizeram de tudo para que eu fosse feliz, me ensinaram a ir à luta para alcançar os meus objetivos e seguir meu coração. Serei eternamente grata a vocês por toda confiança em mim e por permitirem eu trilhar meu próprio caminho. Espero que um dia eu possa retribuir tudo de maravilhoso que vocês já fizeram por mim. Amo muito vocês! Ao meu irmão Saulo, que amo desde antes da barriga da minha mãe começar a crescer. Obrigada por ser meu companheirinho (que há muito tempo já é mais alto que eu), sempre muito carinhoso. Tenho muito orgulho de ser sua irmã e, apesar de você sempre testar minha paciência constantemente, não há nada nessa vida que eu não faria por você. Pode contar comigo sempre!

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes na minha vida, mesmo que à distância. Obrigada por todo carinho! Agradeço em especial aos meus avós paternos Nelson, que hoje me abençoa lá do céu e Janilda, que sempre me acompanharam de perto, proporcionando muito além do que eu precisei. Que apesar de não compreenderem tanto o funcionamento do meu curso, me deram muito amor e carinho, sendo pacientes e compreensivos comigo. À minha tia e duas vezes madrinha, Jeanine, uma mulher forte e batalhadora, que admiro muito pela coragem em seguir seus sonhos, mais que uma tia, uma grande amiga, que está sempre disposta a me ajudar e aconselhar. Obrigada por tudo!

A todos meus amigos de fora da faculdade e pessoas importantes, que sempre terão um lugar especial no meu coração. Sou grata por ter conhecido essas pessoas extraordinárias, que estiveram presentes em diferentes momentos dessa caminhada. Ao Arthur que sempre apoiou minhas decisões e me deu suporte nos primeiros anos da graduação. Em especial aos meus amigos de infância, Ana Beatriz e Leonardo, que permaneceram na minha vida até hoje, mesmo que distantes. Às componentes do grupo FBI, Fernanda e Brenda, que apesar de morarmos muito perto, a correria do dia a dia só nos permite nos encontrar duas vezes por ano. Espero podermos contar uns com os outros sempre!

As minhas amigas componentes do trio “me demito”, que no segundo período da faculdade cruzaram meu caminho e, depois de nos juntarmos com outras três pessoas muito especiais no ano passado, formamos o melhor grupo que o curso de microbiologia já viu: “o melhor squad da micro”. Quem imaginaria que essas seis pessoas, sendo coincidentemente cada

dupla de um bairro, terminariam juntas e se tornariam grandes amigas. Sou muito feliz por vocês fazerem parte da minha vida e muito grata por ter a amizade de pessoas tão sensacionais como: Annalu, minha duplinha e a rainha dos vibrios; Mari, musa fitness e Selena Gomez brasileira; Thaís, a empática do grupo e meu presentinho de 2019; Lucas, o melhor motorista atrasado desse Brasil e Ari, a masterchef e enciclopédia do grupo. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos. Vou levar a amizade de vocês por toda minha vida!

Quero agradecer aos amigos que fiz ao longo desses anos. Minhas parceiras de chapa do Centro Acadêmico, que mesmo exercendo a gestão de forma virtual no ano de 2020, sempre nos ajudamos e tentamos dar nosso melhor para representar os alunos. Aos meus companheiros de turma, por todos os momentos de sofrimento e sucesso compartilhados. Em especial àqueles que fizeram parte da comissão da XXV Semana de Microbiologia e Imunologia, contribuindo para realização de um evento memorável. Agradeço também pelo carinho dos meus veteranos. Minhas amigas da Freguesia, Isadora, Úrsula e Bia. Vocês não imaginam o quanto vocês foram importantes nessa caminhada dos dois últimos anos. Passamos inúmeros momentos maravilhosos e engraçados, principalmente fora da faculdade, que vão ficar guardados na memória. Espero poder viver mais momentos como esses com vocês, independente dos caminhos que a vida nos levar!

A todos os professores que passaram pela minha vida até hoje, compartilhando seus conhecimentos e ensinando, contribuindo para minha formação acadêmica. Vocês são peças fundamentais na vida de todo cidadão. Em especial à professora Hilana, que me permitiu conhecer minha orientadora, ainda na época que estava cursando o ensino médio técnico no IFRJ, contribuindo para minha entrada no laboratório de pesquisa que permaneço até hoje.

Aos componentes do grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha que contribuíram para meu aprendizado ao longo dessa vida de IC, como Bruno, Anna, Beatriz, Jéssyca, Gabriela, Suzanne e Thiago. Obrigada a todos pelo ensinamento e apoio. Quero agradecer aos professores Walter, Márcia, Mateus e Bernadete, que disponibilizaram os equipamentos e espaço físico dos laboratórios, contribuindo para que fosse possível a realização dos experimentos dos meus projetos de pesquisa.

À esta Universidade, ao Instituto de Microbiologia, seu corpo docente e administrativo. Principalmente aos profissionais responsáveis pela graduação e extensão, que sempre foram muito solícitos. Em especial a todos os professores do Instituto de Microbiologia que fizeram eu ter a certeza de ter escolhido o curso certo de graduação, com seu carisma e dedicação aos alunos e ao Instituto.

A Anna Luiza, minha parceira de laboratório e amiga desde o início da graduação. Aquela que compartilhou incontáveis momentos de surtos, alegrias, desesperos e sucesso comigo. Desde o dia que você apareceu no laboratório procurando ajuda, meus dias foram melhores. Só tenho a agradecer por tudo, desde as inúmeras autoclavações ou idas à secretaria para resolver pendências e situações, até nossos momentos únicos e hilários no jardim ou na sala de almoço. Estaremos sempre juntas e shallow now.

Ao meu coorientador Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, agora doutor, que desde o início fomos colocados para trabalhar juntos, resultando na maior e melhor parceria que a comunidade científica já viu. Tenho muita sorte de ter tido a oportunidade de te acompanhar ao longo de toda minha graduação e gratidão de poder ver você alcançando tantas coisas na sua carreira. Obrigada pela enorme paciência, pelos incontáveis ensinamentos, pela parceria, respeito e amizade acima de tudo e por sempre fazer eu me sentir capaz de realizar qualquer coisa. Você foi o melhor coorientador que uma aluna de iniciação científica poderia querer.

À minha orientadora Marinella Silva Laport pela oportunidade, orientação, paciência e suporte na elaboração deste trabalho e de todas as atividades desenvolvidas ao longo da iniciação científica. Obrigada por sempre acreditar em mim e no meu potencial para realização dessa pesquisa.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, PIBIC pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram para minha formação, seja direta ou indiretamente, o meu muito obrigada.

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”
(Madre Teresa de Calcutá)**

RESUMO

ISABELLE RODRIGUES LOPES

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS À ESPONJA MARINHA *Plakina cyanorosea* DO LITORAL DE CABO FRIO (RJ)

Orientadora: Marinella Silva Laport

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os microrganismos associados às esponjas deparam-se com uma grande quantidade de matéria orgânica na água filtrada, liberando exoenzimas para conversão da mesma em nutrientes mais simples. Esses simbiontes constituem uma fonte para busca desses biocatalisadores com propriedades únicas, como halotolerância e resistência a pH e temperatura, sendo de interesse para aplicação em diversos setores industriais. O estudo objetivou o rastreamento da produção de hidrolases por bactérias isoladas da esponja recém-descrita para a costa brasileira *Plakina cyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha). 683 bactérias foram isoladas nos meios BHI, BHI 1:10, Marine, Marine 1:10 e Gauze I a partir de cinco espécimes de *P. cyanorosea*. Após reativação do estoque e cultivo em seu respectivo meio de isolamento a 25°C por 24-96 h, 305 bactérias isoladas foram semeadas em meios sólidos para a verificação da produção das exoenzimas: agarase, amilase, celulase total, lipase, esterase e peptidase. Seguidamente a 96-120 h de incubação a 25°C, a leitura dos resultados foi efetuada, com o cálculo do Índice Enzimático (IE), considerando um $IE \geq 2,0$ característico de uma estirpe potencialmente produtora da exoenzima. A termoestabilidade e a estabilidade a acidez ou alcalinidade foi verificada em meio sólido para as potenciais estirpes agarolíticas. Os extratos brutos de agarase e celulase total foram obtidos por fermentação submersa, com a determinação da atividade pela dosagem de açúcares redutores. A coleção bacteriana se destacou quanto à produção de celulases, em que 87,8% das estirpes tiveram $IE \geq 2,0$ e de agarases, em que de 22 bactérias pré-selecionadas, 19 foram capazes de gerar agarases em meio sólido, com 94,2% demonstrando $IE \geq 2,0$. Das bactérias testadas, 62,6% para peptidases, 61,8% para amilases, 50,4% para esterases e 32,7% para lipases, exibiram $IE \geq 2,0$, respectivamente. Um conjunto de 207 estirpes foram positivas para dois ou mais desses cinco grupos de enzimas analisados, com 73 (35,3%) exibindo atividade para duas, 65 (31,4%) para três, e 55 (26,6%) para quatro hidrolases, respectivamente, e 14 bactérias isoladas (6,7%) apresentaram resultado positivo para os cinco grupos pesquisados. Duas estirpes agarolíticas, *Bacillus* sp. PA2MD8 ($IE = 3,7$) e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 ($IE = 3,9$), e duas celulolíticas, *Vibrio* sp. PL1G11 ($IE = 8,3$) e *Vibrio* sp. PA3G1 ($IE = 7,1$), foram selecionadas como potenciais produtoras. A temperatura de 28°C e o pH 5,0 foram as condições com maiores valores de IE de agarase para *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11. Após 72 h de crescimento em meio de produção mínimo otimizado, tal estirpe exibiu atividade de 0,345 U/mL. As seis hidrolases investigadas tiveram sua produção confirmada nas bactérias isoladas de *P. cyanorosea*, notoriamente as

polissacaridasas. Com base nesses resultados preliminares, o bacterioma cultivável dessa esponja marinha se notabiliza como uma promissora fonte de enzimas com aplicações relevantes nos âmbitos biotecnológico e industrial.

Palavras-chave: comunidade bacteriana, enzimas microbianas, potencial biotecnológico, Homoscleromorpha, *Pseudoalteromonas*.

ABSTRACT

ISABELLE RODRIGUES LOPES

**ANALYSIS OF HYDROLASE PRODUCTION BY BACTERIA ASSOCIATED WITH
THE MARINE SPONGE *Plakina cyanorozea* FROM THE COAST OF CABO FRIO
(RJ)**

Orientadora: Marinella Silva Laport

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The microorganisms associated with the sponges encounter a large amount of organic matter in the filtered water, releasing exoenzymes to convert it into simpler nutrients. These symbionts are characterized as a source to search for these biocatalysts with unique properties, such as halotolerance and resistance to pH and temperature, being of interest for application in several industrial sectors. The study aimed to track the production of hydrolases by bacteria feeding on the first sponge suitable for the Brazilian coast *Plakina cyanorozea* (Porifera, Homoscleromorpha). 683 bacteria were formed in BHI, BHI 1:10, Marine, Marine 1:10 and Gauze I media from five specimens of *P. cyanorozea*. After reactivation of the stock and cultivation in its respective isolation medium at 25°C for 24-96 h, 305 ingredients were sown in solid media to verify the production of exoenzymes: agarase, amylase, total cellulase, lipase, esterase and peptidase. Then at 96-120 h of incubation at 25°C, the results were read, with the calculation of the Enzyme Index (EI), considering an $EI \geq 2.0$ characteristic of a strain potentially producing the exoenzyme. Thermostability and stability to acidity or alkalinity were verified in solid medium for potential agarolytic strains. The crude extracts of agarase and cellulase were obtained by submerged fermentation, with the determination of activity by the dosage of reducing sugars. The bacterial collection stood out as to the production of cellulases, in which 87.8% of the strains had $IE \geq 2.0$ and of agarases, of which 22 pre-selected bacteria, 19 were able to generate agarases in solid medium, with 94, 2% showing $IE \geq 2.0$. Of the bacteria tested, 62.6% for peptidases, 61.8% for amylases, 50.4% for esterases and 32.7% for lipases, exhibited an $IE \geq 2.0$, respectively. A set of 207 strains were positive for two or more three groups of promotion enzymes, with 73 (35.3%) exhibiting activity for two, 65 (31.4%) for three, and 55 (26.6%) for four hydrolases, respectively, and 14 biological substances (6.7%) positive result for the five groups surveyed. Two agarolytic strains, *Bacillus* sp. PA2MD8 ($IE = 3.7$) and *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 ($IE = 3.9$), and two cellulolytic ones, *Vibrio* sp. PL1G11 ($IE = 8.3$) and *Vibrio* sp. PA3G1 ($IE = 7.1$), were selected as potential producers. The temperature of 28 ° C and pH 5.0 were the conditions with the highest values of IE of agarase for *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11. After 72 h of growth in minimal optimized production medium, this strain showed an activity of 0.345 U / mL. The six hydrolases investigated had their production confirmed in *P. cyanorozea* bacteria, notably as polysaccharidases. Based on

preliminary results, the cultivable bacterioma of this marine sponge stands out as a promising source of enzymes with relevant applications in the biotechnological and industrial fields.

Keywords: bacterial community, microbial enzymes, biotechnological potential, Homoscleromorpha, Pseudoalteromonas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Anatomia geral do corpo de uma esponja marinha adulta. (A) Esquema representativo macroscópico geral simplificado. A água do mar entra pelos óstios pelo fluxo gerado pelo batimento dos flagelos dos coanócitos e segue pelo sistema aquífero da esponja, saindo pelo ósculo. (B) Visão microscópica com a organização das camadas celulares; observar a presença significativa de microrganismos simbiotes no mesoílo (Fig.1A: Adaptado de Webster e Thomas, 2016. Fig.1B: Adaptado de Hentschel *et al.*, 2012; autorização de uso no Anexo III). 22
- Figura 2** Distribuição geográfica de espécies descritas do gênero *Plakina* (Word Porifera Database, Acesso em: 30/11/2020). Países em azul são aqueles cujas costas ou territórios marítimos tiveram espécies de *Plakina* caracterizadas. Espécies com estudos de microbiota caracterizada estão marcados com uma estrela. 27
- Figura 3** Fotos da morfologia externa e variação de cor da esponja *Plakina cyanorosea* tirada durante a coleta das esponjas marinhas na região da “Poça de Maré do Carolina” (RJ) pelo Professor Doutor Guilherme Muricy (Museu Nacional – UFRJ) com participação do grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha do IMPG-UFRJ (Muricy *et al.*, 2019). 28
- Figura 4** Riqueza microbiana de OTU (Operational Taxonomic Unit) em comunidades associadas a esponjas em relação a filo. Perfil taxonômico do microbioma de 81 espécies diferentes de esponjas do SMP (Thomas *et al.*, 2016) obtido por meio de técnicas independentes de cultivo. Foram observados 39 filós entre os domínios Bacteria e Archaea (Adaptado de Pita *et al.*, 2018; autorização de uso no Anexo III). 32
- Figura 5** Panorama geral das aplicações industriais de hidrolases agarase, celulase, amilase, esterase, lipase e protease. Quadros indicam os diferentes setores industriais e asteriscos coloridos indicam qual a respectiva enzima utilizada na aplicação descrita. 38
- Figura 6** Placas representativas dos resultados de triagem da produção de exoenzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico das bactérias isoladas de *P. cyanorosea*. Placa correspondente à enzima triada: agarase (a), amilase (b), celulase (c), esterase (d), lipase (e) e peptidase (f). 66
- Figura 7** Gráfico de setores com o número de estirpes isoladas de *P. cyanorosea* (n = 207) com atividade positiva para dois ou mais grupos das cinco hidrolases testadas (amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase). Gráficos menores representam o número de estirpes positivas para cada grupo enzimático em cada grupo. 70
- Figura 8** Placas dos resultados do teste de produção de β -glicosidase pelas bactérias celulolíticas *Vibrio* sp. PA3G1 (1) e *Vibrio* sp. PL1G11 (2). A seta indica a 73

presença do complexo molecular ao redor da colônia da estirpe *Vibrio* sp. PL1G11.

- Figura 9** Placas referentes à verificação da manutenção da atividade enzimática do extrato bruto de agarase e celulase em relação ao tempo de incubação, sendo os números referentes às estirpes: *Vibrio* sp. PL1G11 (1), *Vibrio* sp. PA3G1 (2), *Bacillus* sp. PA2MD8 (3) e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 (4). 74
- Figura 10** Tubos representativos da atividade positiva de agarase da estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 após 72 h de crescimento em meio líquido pela dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS, sendo amarelo: sem atividade, laranja: atividade positiva. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Conhecimento atual sobre o potencial biocatalítico de hidrolases do microbioma de esponjas.	54
Tabela 2	Lista de meios de culturas sólidos utilizados para a triagem da produção das exoenzimas hidrolíticas das bactérias isoladas de <i>P. cyanorosea</i> .	61
Tabela 3	Testes de triagem da produção de exoenzimas hidrolíticas das bactérias isoladas de <i>P. cyanorosea</i> de acordo com os meios de cultura usados no isolamento.	68
Tabela 4	Resultados dos testes de triagem para cada exoenzima hidrolítica testada das bactérias isoladas de <i>P. cyanorosea</i> .	69
Tabela 5	Afiliação taxonômica por análise das sequências do gene <i>rrs</i> (16S rRNA) das bactérias isoladas de <i>P. cyanorosea</i> consideradas como potenciais produtoras enzimáticas.	71
Tabela 6	Valores médios de IE das estirpes agarolíticas <i>Bacillus</i> sp. PA2MD8 e <i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11 sob diferentes temperaturas de crescimento em meio de Hu (pH 7,8 ± 0,2).	72
Tabela 7	Valores médios de IE das estirpes agarolíticas <i>Bacillus</i> sp. PA2MD8 e <i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11 frente a diferentes faixas de pH, a 28°C em meio de Hu (pH ajustado).	72
Tabela 8	Valores médios de IE das estirpes agarolíticas <i>Bacillus</i> sp. PA2MD8 e <i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11 frente a diferentes faixas de pH, a 37°C em meio de Hu (pH ajustado).	72
Tabela 9	Resumo das principais informações das estirpes bacterianas isoladas de <i>P. cyanorosea</i> consideradas potenciais produtoras enzimáticas de agarase e celulase.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHG	3,6-anidro- α -L-galactose
AOS	Agaro-oligossacarídeos
ASW	do inglês <i>artificial seawater</i> (Água do mar artificial)
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de cultura tipo americana)
BHI	do inglês <i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de coração e cérebro)
BPI	Biotecnologia Pesquisa e Inovação
CAZyme	do inglês <i>carbohydrate-active enzyme</i> (Enzima ativa de carboifrato)
CCD	Cromatografia em camada fina
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
CMC-Na	Carboximetilcelulose-Na
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DP4	do inglês <i>degree of polymerization 4</i> (Grau de Polimerização 4)
DP6	do inglês <i>degree of polymerization 6</i> (Grau de Polimerização 6)
DP7	do inglês <i>degree of polymerization 7</i> (Grau de Polimerização 7)
DSMZ	do alemão <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> (Coleção alemã de microrganismos e culturas celulares)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)
EUA	Estados Unidos da América
G	β -D-galactopiranosose
GHs	Glicosídeo hidrolases
HMA	do inglês <i>high microbial abundance</i> (alta abundância microbiana)
IU	Unidade de atividade enzimática
IUBMB	do inglês <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
L6S	L-galactose-6-sulfato
LB	Luria-Bertani
LMA	do inglês <i>low microbial abundance</i> (baixa abundância microbiana)
MEROPS	Banco de dados online para peptidases e seus inibidores
MN/UFRJ	Museu Nacional/UFRJ
NA2	Neoagarbiose
NA4	Neoagarotroatose
NA6	Neoagarohexose
NAO	Neoagaro-oligossacarídeo
OTU	do inglês <i>Operational Taxonomic Unit</i> (Unidade Taxonômica Operacional)
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PMSF	do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoreto de fenilmetilsulfonil)
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SAGs	do inglês <i>single amplified genomes</i> (genomas amplificados únicos)
SDS	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecilsulfato de sódio)
SMP	do inglês <i>Sponge Microbiome Project</i> (Projeto do Microbioma de Esponja)
UFC	Unidades formadoras de colônias

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Esponjas Marinhas.....	20
1.2 Classe Homoscleromorpha: Gênero <i>Plakina</i>	24
1.3 Comunidades procarióticas associadas às esponjas marinhas.....	28
1.4 Comunidades procarióticas associadas à Classe Homoscleromorpha.....	32
1.5 Enzimas microbianas.....	34
1.6 Enzimas microbianas marinhas.....	43
1.7 Enzimas do microbioma de esponjas	48
2 JUSTIFICATIVA.....	58
3 OBJETIVOS	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Coleta e processamento das esponjas e isolamento bacteriano.....	60
4.2 Triagem da produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico.....	60
4.3 Identificação molecular das estirpes potenciais produtoras de exoenzimas.....	61
4.4 Estabilidade da produção de agarase total em meio sólido sob diferentes temperaturas e pH.....	62
4.5 Triagem da produção de β -glicosidase em meio sólido.....	63
4.6 Produção do extrato bruto enzimático de agarase e celulase.....	63
4.7 Investigação da atividade de agarase e celulase do extrato bruto enzimático.....	63
5 RESULTADOS.....	66
5.1 Coleta e processamento das esponjas e isolamento bacteriano.....	66
5.2 Triagem da produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico.....	66
5.3 Identificação molecular das estirpes potenciais produtoras de exoenzimas.....	71
5.4 Estabilidade da produção de agarase total em meio sólido sob diferentes temperaturas e pH.....	71
5.5 Triagem da produção de β -glicosidase em meio sólido.....	72

5.6 Produção do extrato bruto enzimático de agarase e celulase.....	73
5.7 Investigação da atividade de agarase e celulase do extrato bruto enzimático.....	74
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO.....	90
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9 ANEXOS.....	106
9.1 Anexo I: Meios de cultura.....	106
9.2 Anexo II: Tampões e Reagentes.....	111
9.3 Anexo III: Autorização para uso das imagens na Introdução.....	112
9.4 Anexo IV: Certificados.....	114
9.5 Anexo V: Autoria e Coautoria em Artigos Científicos.....	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas Marinhas

As esponjas representam os mais antigos metazoários pertencentes ao filo Porifera, com relato de fósseis de poríferos nos oceanos desde o Período Pré-Cambriano, há 600 milhões de anos atrás (Yin *et al.*, 2015). Esses animais, encontrados em ambientes marinhos ou de água doce, são caracterizados por serem sésseis e filtradores (Bergquist, 1978). Apresentam uma estrutura corporal simples, constituindo-se de diversos tipos celulares especializados em bombear água, removendo as partículas em suspensão e transportando nutrientes e oxigênio para esponja (Hooper e van Soest, 2002; Brusca, Moore e Shuster, 2016). As esponjas se dispõem em variados tamanhos, cores, formas e consistências (Karleskint, Tuner e Small, 2010). As formas podem ser maciças e esféricas, tubulares e incrustantes ou em até diversas outras dessas variações, com sua consistência podendo ser dura, mole, compressível ou frágil. Essas formas variam entre espécies e gêneros distintos, mas também podem ser diferentes entre indivíduos da mesma espécie por conta da hidrodinâmica, luz e turbidez do ambiente ao redor. Os tamanhos compreendem desde uma faixa de espécies medindo alguns milímetros, podendo chegar até metros, como por exemplo a esponja de vidro (Hexactinellida, subfamília Lanuginellinae) que mede 3,5 m de comprimento e 2,0 m de largura (maior registro até o momento) (Wagner e Kelley, 2016).

Elas podem ser encontradas desde regiões rasas e superficiais até aquelas superiores a 8.840 metros de profundidade, com maior prevalência nos habitats não poluídos do litoral, recifes tropicais, regiões frias temperadas e mares antárticos. Estão distribuídas desde os trópicos até altas latitudes, sendo um componente importante da fauna bentônica em habitats temperados, tropicais e polares (Barthel, Gutt e Tendal, 1991; Bell e Barnes, 2000; Vacelet e Dupont, 2004; van Soest *et al.*, 2012). As espécies dulcícolas estão presentes em desertos, florestas tropicais equatoriais, mangues e lagos, e até em habitats subterrâneos. Existem 9.356 espécies de esponjas formalmente aceitas no *World Porifera Database*, cujo número vem crescendo a cada ano (van Soest *et al.*, 2020).

Essencialmente, as esponjas têm uma organização anatômica composta de um corpo multicelular dividido em três camadas: (i) a pinacoderme, a mais externa, uma monocamada de células epitelióides achatadas não-ciliadas, os pinacócitos; (ii) a coanoderme, cujas células flageladas constituintes, os coanócitos, revestem a maioria das superfícies internas do corpo da esponja; (iii) e, entre essas camadas, está situado o mesoílo. Quanto à espessura, pinacoderme e coanoderme geralmente têm uma camada celular uniforme e o mesoílo, que por sua vez varia, pode ser muito delgado em alguns representantes incrustrantes ou mais espesso em espécies

maiores. O corpo da esponja apresenta pequenos poros, ao longo do pinacoderme, pelos quais a água entra, é conduzida através do sistema aquífero e sai por um ou mais orifícios maiores, denominados ósculos. Esses pequenos poros são chamados poros dermais ou óstios, dependendo se a abertura é cercada por várias células ou uma célula, respectivamente (**Figura 1A**). Pelo seu movimento flagelar, os coanócitos vão ser responsáveis por bombear grandes volumes de água. A pinacoderme é uma camada externa simples de células, a exopinacoderme, e também reveste algumas das cavidades internas do sistema aquífero onde os coanócitos não estão presentes, formando o endopinacoderme. A coanoderme sempre se apresenta em monocamada, podendo variar em relação ao formato das câmaras coanocitárias. (Simpson, 1984; Karleskint, Tuner e Small, 2010; Leys e Hill, 2012).

O mesoílo desempenha papéis vitais na digestão, produção de gametas, secreção do esqueleto e transporte de nutrientes e produtos residuais por células ameboides especiais. Essa camada conectiva possui uma consistência gelatinosa e não entra em contato diretamente com a água, sendo altamente variável em termos de graus de desenvolvimento e dos tipos celulares presentes. A maioria dessas células são totipotentes, sendo capazes de mudar de um tipo para outro, conforme necessário. Os grupos celulares especializados de mais importante destaque no mesoílo são: (i) os esclerócitos, que produzem os componentes minerais do esqueleto, as espículas; (ii) os espongóцитos, encarregados da síntese da espongina, componente proteico do esqueleto orgânico das esponjas (fibras de espongina); (iii) e os arqueócitos, que realizam a digestão e o transporte interno, sendo semelhantes aos macrófagos encontrados no sistema imune de outras linhagens de metazoários. Microrganismos simbiotes, principalmente procariotos, também estão presentes frequentemente nessa camada fundamental, responsáveis por uma série de funções cruciais para o hospedeiro (**Figura 1B**) (Ereskovsky, 2010; Pechenik, 2015; Brusca, Moore e Shuster, 2016).

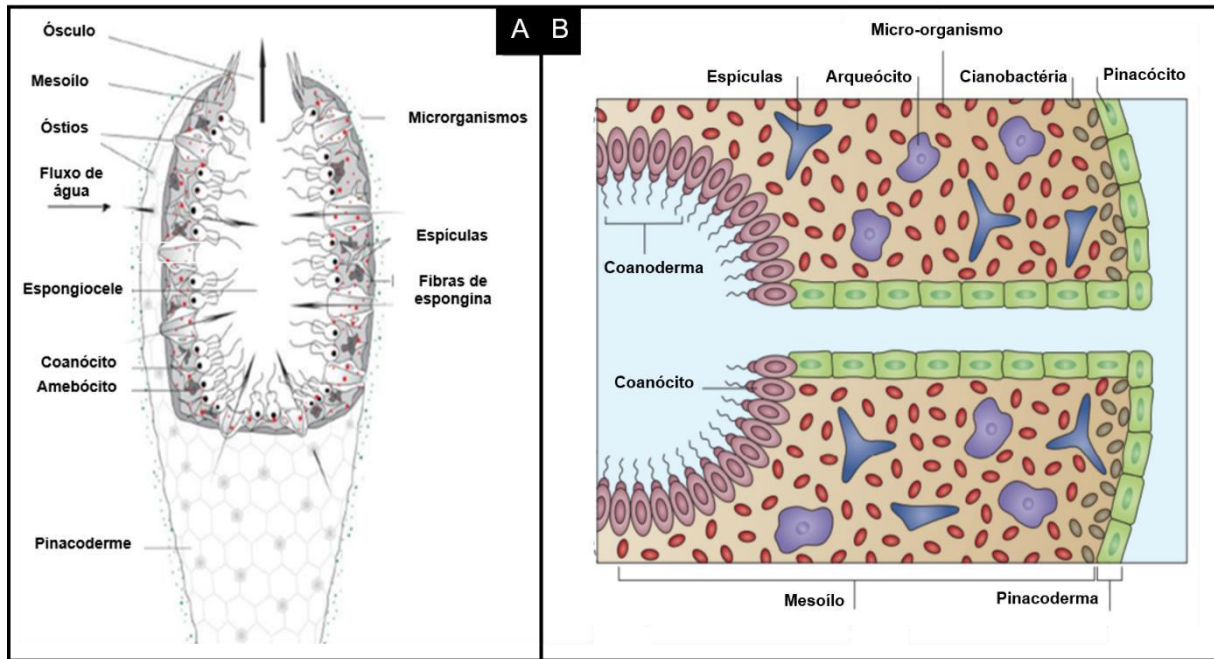


Figura 1 - Anatomia geral do corpo de uma esponja marinha adulta. (A) Esquema representativo macroscópico geral simplificado. A água do mar entra pelos óstios pelo fluxo gerado pelo batimento dos flagelos dos coanócitos e segue pelo sistema aquífero da esponja, saindo pelo ósculo. (B) Visão microscópica com a organização das camadas celulares; observar a presença significativa de microrganismos simbiotes no mesoílo (Fig.1A: Adaptado de Webster e Thomas, 2016. Fig.1B: Adaptado de Hentschel *et al.*, 2012; autorização de uso no Anexo III).

Através da filtração de uma grande quantidade de água, as esponjas obtêm oxigênio, matéria orgânica dissolvida e microrganismos. Elas removem bactérias em suspensão com uma eficiência de 75 a 99% (Reiswig, 1975). O sistema aquífero transporta a água através da esponja, levando-a para as células responsáveis pela troca de gases e recolhimentos de células e moléculas para nutrição. À medida que a água circula pela esponja, bactérias, plâncton e matéria orgânica dissolvida são capturados pelos coanócitos e digeridos por várias células. Simultaneamente, a água expelida pela esponja carrega os resíduos nitrogenados e o material não digerido (Brusca, Moore e Shuster, 2016). Mesmo apresentando uma grande quantidade de microrganismos associados, as esponjas são capazes de distinguir bactérias que se tornarão residentes de outras que serão desviadas para nutrição (Wilkinson, Garrone e Vacelet, 1984; Wehrl, Steinert e Hentschel, 2007).

Esses invertebrados têm potencial para alterar a coluna de água por meio da sua alta capacidade de filtração e liberação de metabólitos secundários, auxiliando na sobrevivência de diversas espécies marinhas, como os corais, além de contribuírem com os ciclos biogeoquímicos e formação do relevo oceânico (Bell, 2008). As esponjas que habitam recifes de coral participam da reciclagem eficiente para matéria orgânica dissolvida (DOM),

convertendo-a pela renovação rápida de células esponjosas em detritos celulares (Goeij *et al.*, 2013). Alguns dos papéis funcionais das esponjas nos recifes de corais incluem: (i) aumentar a sobrevivência dos corais ligando os mesmos à estrutura dos recifes, assim impedindo o acesso por organismos escavadores aos seus esqueletos; (ii) reciclagem de nutrientes e aumento da produção primária através de simbioses microbianas com capacidades bioquímicas especiais; (iii) facilitação da regeneração de recifes danificados fisicamente, pela estabilização temporária de carbonato (Wulff, 2001; Brusca, Moore e Shuster, 2016). Diante do cenário atual de drásticas mudanças climáticas, um aumento do interesse nos estudos de monitoramento desses invertebrados em recifes tem acontecido, tendo em vista que em alguns recifes de coral as esponjas poderiam se tornar os organismos dominantes. Devido às alterações oceanográficas, esses recifes dominados por esponjas podem ser raros (Bell *et al.*, 2013; Lesser e Slattery, 2020). Além disso, a extinção em massa das espécies coralíneas também seria acompanhada do desaparecimento sem precedentes de esponjas ainda não descritas (Carballo e Bell, 2020).

Evidências sugerem que as esponjas provavelmente mantiveram o estilo de vida e a complexidade morfológica dos primeiros animais, sendo consideradas como um dos pontos de partida da evolução animal (Nielsen, 2008). Quando analisadas a partir de perspectivas morfológicas, genômicas e de desenvolvimento, as esponjas parecem combinar características de organismos eucarióticos de célula única e também de animais multicelulares, compartilhando características com os coanoflagelados, nossos parentes não-animais mais próximos, constituindo um interessante organismo-modelo para estudos evolutivos (Adamska, 2016). As esponjas apresentam alguns atributos dos demais metazoários, como: multicelularidade derivada de camada embrionária; junções especializadas entre as células; elementos contráteis de actina-miosina e colágeno do tipo IV. Análises genéticas moleculares indicam que o filo Porifera é monofilético e pertencente ao Metazoa (Dunn *et al.*, 2008; Philippe *et al.*, 2009). A hipótese '*Porifera-first*', coloca os poríferos como o grupo relativo mais próximo de todos os outros metazoários (Nielsen, 2019).

Existem 9.356 espécies de esponjas formalmente aceitas no *World Porifera Database*, cujo número vem crescendo a cada ano (van Soest *et al.*, 2020). Em relação a divisão do filo Porifera, este apresenta atualmente quatro classes: Hexactinellida, Demospongiae, Calcarea e Homoscleromorpha (Gazave *et al.*, 2012), que se distinguem com base em características celulares, anatômicas e de desenvolvimento (Renard *et al.*, 2013). Demospongiae é a mais diversa classe do filo Porifera, incluindo 82,8% de todas as espécies de esponjas com 7.750 espécies em todo o mundo, cujo esqueleto é o único que pode apresentar fibras de espongina (van Soest *et al.*, 2020); Hexactinellida é caracterizada por possuir um esqueleto de espículas

de sílica, e são comumente chamadas de esponjas-de-vidro e o nome da classe é devido ao fato das espículas possuírem seis pontas, distribuídas em seis eixos; Calcarea é uma classe de esponjas que se distingue dos outros poríferos pelos seus indivíduos serem constituídos por espículas de carbonato de cálcio; e Homoscleromorpha é a classe mais recentemente proposta, caracterizada por suas características ecológicas e evolutivas únicas (Gazave *et al.*, 2012; Brusca, Moore e Shuster, 2016).

1.2 Classe Homoscleromorpha: Gênero *Plakina*

Ao longo dos anos, a classe Homoscleromorpha passou por diversos rearranjos taxonômicos internos com seu *status* elevado de subordem para ordem, subclasse e, finalmente, classe (Domingos, Moraes e Muricy, 2013). Em 1880, Schulze descreveu os gêneros *Plakina*, *Plakortis* e *Plakinastrella* e criou a família Plakinidae, atribuída à ordem Tetractinellida (classe Demospongiae) por conta da forma das espículas. Posteriormente, Topsent (1928) adotou o nome Homosclerophora com a composição de três famílias: Oscarellidae, Corticiidae e Plakinidae. Em 1973, Lévi elevou a Homosclerophorida à categoria de subclasse, fora de Tetractinomorpha. *Corticium* foi alocado pela primeira vez em Plakinidae, e a subclasse foi dividida em duas famílias, uma com espículas, Plakinidae, e outra sem espículas, Oscarellidae (Schulze, 1880; Topsent, 1928 e Lévi, 1973 *apud* Boury-Esnault *et al.*, 2013). Posteriormente, Boury-Esnault e colaboradores (1995) fundiram as duas famílias Oscarellidae e Plakinidae em uma única, Plakinidae. Em 2010, Gazave e colaboradores restauraram as duas famílias Oscarellidae e Plakinidae com base nas análises filogenéticas de marcadores moleculares como os genes codificadores das regiões 18S e 28S do RNA ribossomal (rRNA) e de enzimas mitocondriais. Por fim, Gazave e colaboradores (2012) sugeriram uma quarta nova classe do filo Porifera, devido a uma série de particularidades anatômicas, morfológicas, embriológicas e dos resultados de reconstruções filogenéticas, demonstrando um clado isolado até então.

A classe Homoscleromorpha alberga atualmente apenas uma ordem, Homosclerophorida, na qual 126 espécies descritas estão agrupadas nas famílias Oscarillidae e Plakinidae, segundo o *World Porifera Database*. A família Oscarillidae é caracterizada pela ausência de um esqueleto por não apresentarem espículas, além da presença de um gene mitocondrial específico, *tatC*, codificador da translocase mitocondrial TatC (Gazave *et al.*, 2013). Essa família apresenta dois gêneros: *Oscarella*, com 24 espécies descritas e *Pseudocorticium*, com uma espécie descrita, *Pseudocorticium jarrei* (van Soest *et al.*, 2020). Embora as esponjas desse grupo sejam relativamente bem estudadas, as relações filogenéticas

entre os membros de Oscarellidae e a validade do gênero *Pseudocorticium* permanecem em aberto (Boury-Esnault *et al.*, 2013). A família Plakinidae abriga esponjas que majoritariamente possuem esqueleto devido a presença de espículas (Gazave *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2017), sendo composta por sete gêneros: *Aspiculophora*, *Corticium*, *Placinolopha*, *Plakina*, *Plakinastrella*, *Plakortis* e *Tetralophophora* (van Soest *et al.*, 2020).

Essa classe abriga um grupo de esponjas exclusivamente marinhas, normalmente situadas em águas rasas, em uma profundidade de 8 a 60 metros, porém também podem ser encontradas acima de 1.000 metros de profundidade (Muricy e Diaz, 2002). Até o presente momento, as espécies habitam substratos rígidos, comumente em ambientes semiescuros ou escuros e algumas espécies podem crescer exclusivamente em substratos coralíneos (Ereskovsky, Lavrov e Willenz, 2013). Essas esponjas são caracterizadas ainda por terem um tamanho reduzido, podendo ser incrustantes ou irregulares, com a superfície relativamente lisa (Ereskovsky, 2010). São cosmopolitas, ocorrendo desde o equador até os pólos e a região entre-marés até o oceano profundo, já tendo sido descritas espécies no Oceano Pacífico, Mediterrâneo e Atlântico Tropical Ocidental (Domingos, Moraes e Muricy, 2013). Entre os habitantes das cavernas submarinas, representam um grupo taxonômico abundante e diversificado; 82% das espécies de esponjas da classe Homoscleromorpha do Mediterrâneo podem ser encontradas em cavernas submarinas e 41% delas são exclusivas de cavernas (Ereskovsky *et al.*, 2009).

A anatomia das esponjas pertencentes a classe Homoscleromorpha é caracterizada por grandes câmaras coanocitárias, sem córtex e geralmente com espículas silicosas organizadas, que podem até estar ausentes (Ereskovsky *et al.*, 2009). Tanto os animais pertencentes à classe Homoscleromorpha quanto aos demais metazoários possuem um grande número comum de genes para adesão e sinalização celular (Gazave *et al.*, 2010; Nielsen, 2012). Essas esponjas são a única linhagem do filo Porifera na qual as camadas celulares, tanto em larvas quanto em adultos, são muito semelhantes às de Eumetazoa, podendo ser consideradas como um epitélio verdadeiro. Eles possuem uma membrana basal incluindo fibrilas de colágeno IV e laminina. Os pinacócitos e as células no estágio larval são conectados por junções celulares especializadas. Eles realizam verdadeira morfogênese epitelial que consiste em movimentos morfogenéticos das células unidas aos seus vizinhos em uma camada, muito rara nas demais classes de esponjas. A larva cinctoblástula singular de Homoscleromorpha já foi considerada um possível modelo ancestral de todos os metazoários (Nielsen, 2008; 2012).

Apesar de sua importância, existe uma carência do conhecimento a respeito da diversidade e distribuição da classe Homoscleromorpha na maioria das regiões do mundo (Domingos, Lage e Muricy, 2016). Esse número baixo de espécies possivelmente reflete a

escassez de estudos taxonômicos e a dificuldade de identificá-las e coletá-las em seus habitats críticos como cavernas submarinas, saliências e parte inferior de rochas e corais (Lage *et al.*, 2018a, b; Grenier *et al.*, 2020). O interesse científico nessa classe aumentou nos últimos anos devido a estudos bioquímicos e filogenéticos moleculares que indicam que eles podem estar mais próximos da linha principal de evolução animal do que os outros grupos de esponjas (Gazave *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2018).

Os poríferos da família Plakinidae geralmente exibem as seguintes características: (i) presença ou ausência de esqueleto silicoso; (ii) presença ou ausência de córtex associado ao sistema aquífero e câmaras coanocitárias; e (iii) espículas de diferentes tamanhos. A maioria das espécies de Plakinidae é geralmente encontrada em ambientes de difícil acesso, como cavernas ou a parte de baixo de rochas, dificultando sua coleta e levando a uma subestimação de sua biodiversidade (Domingos, Moraes e Muricy, 2013). O gênero é caracterizado pela presença de espículas na superfície do corpo da esponja e nos canais localizados nos limites do sistema aquífero (Muricy e Diaz, 2002). Entretanto, essa classificação baseada nas espículas é um tanto questionável, visto que, foi relatada uma espécie, *Plakina nathaliae*, com a ausência de espículas. Tal fato leva a necessidade de uma reavaliação taxonômica do gênero e da própria família e possível subdivisão do mesmo (Ruiz *et al.*, 2017).

Atualmente, o gênero *Plakina* apresenta 39 espécies, com 14 delas descritas nos últimos dez anos (Grenier *et al.*, 2020; van Soest *et al.*, 2020). As diferentes espécies de *Plakina* estão distribuídas pelos Mares Mediterrâneo e do Caribe e nos Oceanos Atlântico Ocidental Tropical, Pacífico Oriental e Ocidental, e Índico (**Figura 2**). Em 2016, Domingos, Lage e Muricy reportaram 27 espécies de esponjas Homoscleromorpha no Atlântico Tropical Oeste, com sete espécies exclusivamente endêmicas do litoral brasileiro, todas pertencentes à família Plakinidae, e algumas espécies exibindo diversos morfotipos diferentes. No estudo de Lage e colaboradores (2018), três espécies novas foram caracterizadas, apresentando caracteres morfológicos anteriormente desconhecidos para o gênero *Plakina*, como a inclusão de novos tipos de espículas e presença de papilas. Recentemente, usando uma abordagem de taxonomia integrativa, combinando análises morfológicas, moleculares e metabolômicas, duas espécies, *Plakina cyanorosea* (**Figura 3**) e *Plakina cabofriense*, foram descritas na região de Cabo Frio, Rio de Janeiro (RJ). Ambas abrigam diversas comunidades de simbiontes microbianos, incluindo morfologias anteriormente desconhecidas (Muricy *et al.*, 2019). Grenier e colaboradores (2020) propuseram mais uma nova espécie, *Plakina doudou*, em uma caverna subterrânea na ilha da Martinica, reabrindo a discussão sobre a urgência de uma pesquisa mais ativa na taxonomia de Plakinidae em ambientes pouco investigados.

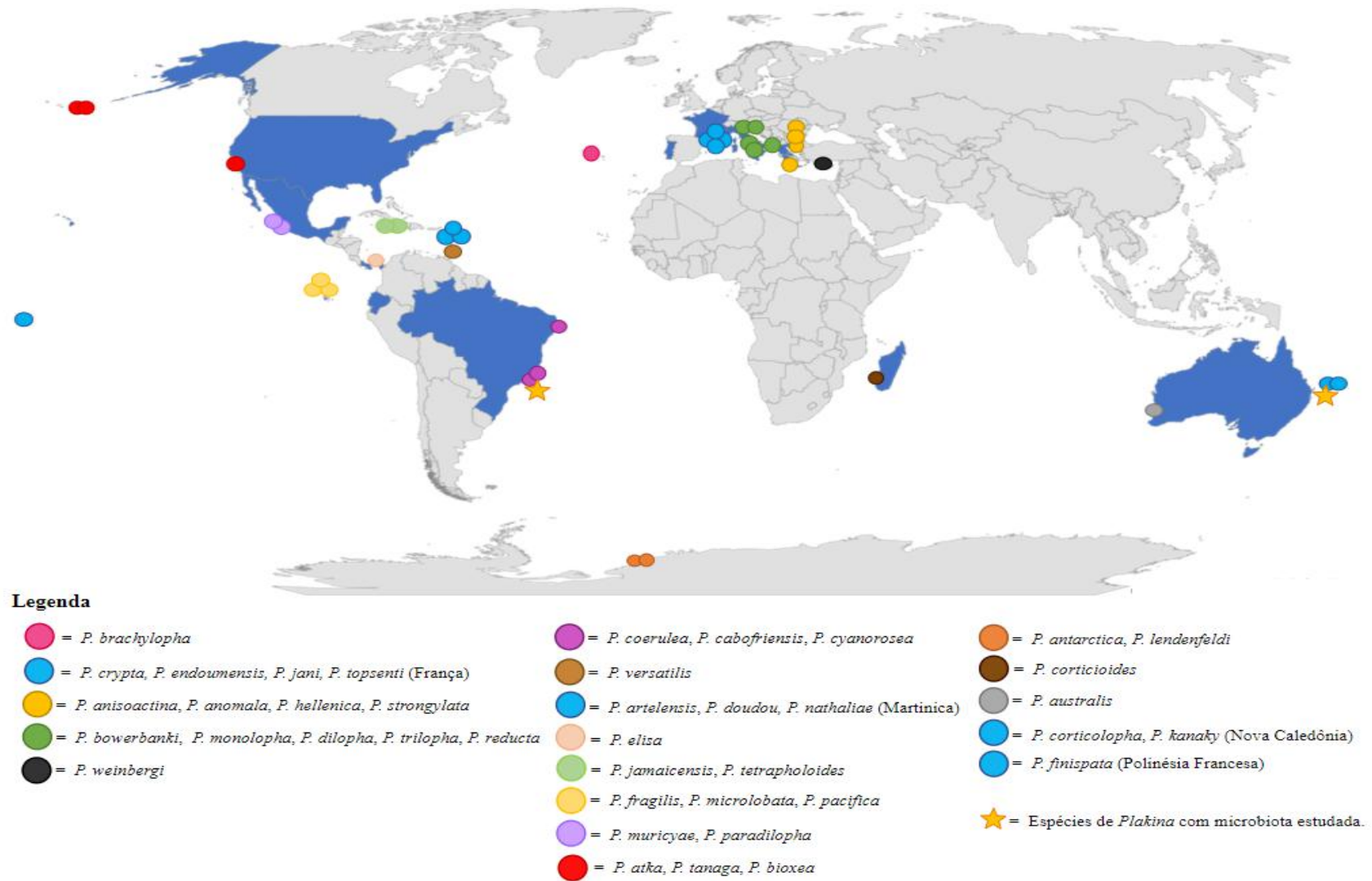


Figura 2 - Distribuição geográfica de espécies descritas do gênero *Plakina* (Word Porifera Database, Acesso em: 30/11/2020). Países em azul são aqueles cujas costas ou territórios marítimos tiveram espécies de *Plakina* caracterizadas. Espécies com estudos de microbiota caracterizada estão marcados com uma estrela.

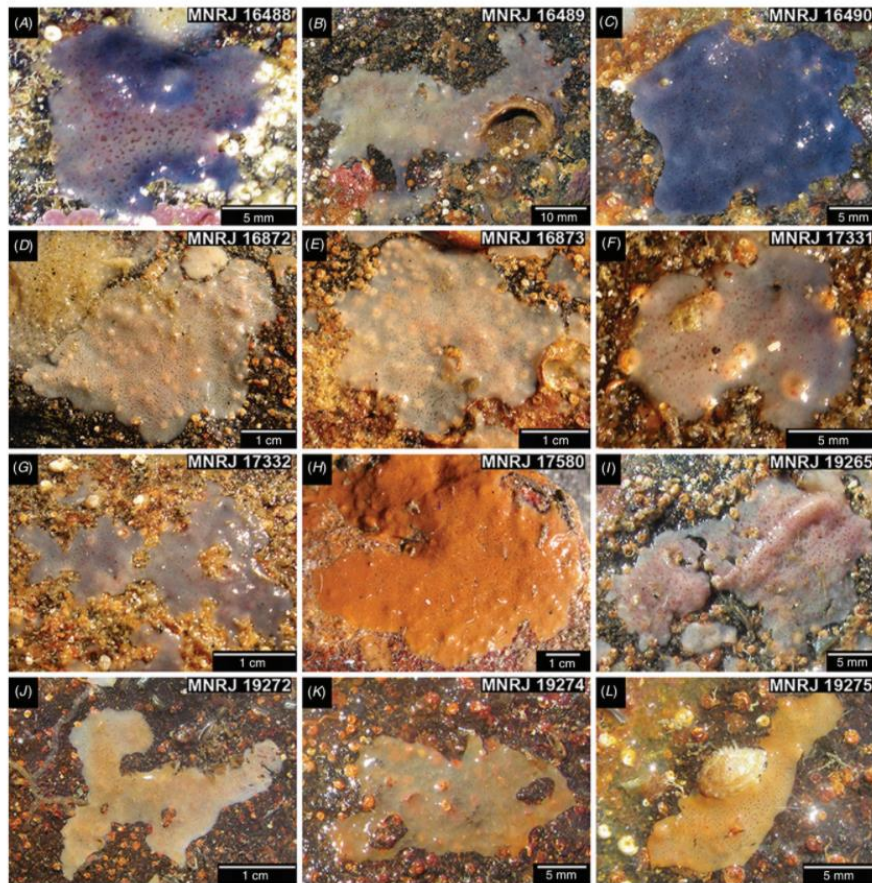


Figura 3: Fotos da morfologia externa e variação de cor da esponja *Plakina cyanorosea* tirada durante a coleta das esponjas marinhas na região da “Poça de Maré do Carolina” (RJ) pelo Professor Doutor Guilherme Muricy (Museu Nacional – UFRJ) com participação do grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha do IMPG-UFRJ (Muricy *et al.*, 2019).

1.3 Comunidades procarióticas associadas às esponjas marinhas

Organismos multicelulares não podem mais ser considerados indivíduos pelas definições clássicas do termo, visto que todos são um holobionte natural, consistindo no hospedeiro e suas comunidades microbianas associadas (Margulis e Fester, 1991). O conteúdo genômico coletivo do hospedeiro e de seus simbiontes microbianos associados forma o hologenoma (Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008). Animais e plantas tiveram sua origem na vida microbiana e permaneceram em estreita associação com eles desde então. Mudanças nos parâmetros ambientais, como a dieta, podem causar rápidas alterações na microbiota, podendo trazer benefícios ao holobionte a curto prazo, como também podem ser hereditárias e levar a cooperações duradouras. A aquisição de microrganismos e genes microbianos é um mecanismo poderoso para impulsionar a evolução da complexidade biológica. Essas associações podem ser de tipos distintos, principalmente em níveis diferentes de mutualismo, onde o hospedeiro e o simbionte se beneficiam da interação e, em grau muito menor, parasitismo, onde o simbionte

se beneficia e o hospedeiro sofre danos. Com os últimos avanços em métodos moleculares, ficou evidente que todos os metazoários vivem em estreita associação com centenas ou milhares de diferentes espécies microbianas e que, em muitos casos, o número de microrganismos simbióticos e suas informações genéticas combinadas excedem em muito o número celular de seus hospedeiros (Rosenberg e Zilber-Rosenberg, 2011, 2016). Tendo em vista que as esponjas apresentam um consórcio microbiano bem diverso e abundante, esses animais podem ser considerados holobiontes (Webster e Taylor, 2012; Baedke *et al.*, 2020).

A relação entre microrganismos e esponja é uma das interações mais antigas, acreditando-se que essa associação provavelmente está na origem do sucesso evolutivo e ecológico do filo Porifera (Lee, Lee e Lee, 2001; Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008). A comunidade microbiana simbiote fornece benefícios para o hospedeiro, por exemplo, através de produtos microbianos que mediam a atividade protetora frente a patógenos oportunistas e possíveis competidores; a produção de vitaminas, visto que os simbiotes de esponja são enriquecidos em genes relacionados à síntese de vitaminas, como tiamina (vitamina B1) e cobalamina (vitamina B12), sugerindo que os simbiotes podem satisfazer a demanda do hospedeiro por essas vitaminas essenciais (Selvin *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2017); o sequestro e metabolização de elementos químicos tóxicos (Santos-Gandelman *et al.*, 2014b); funções defensivas que se relacionam à proteção e resposta ao estresse contra DNA, patógenos e toxinas estranhas, diante da exposição aos mesmos devido à atividade de bombeamento do hospedeiro; além de participarem de forma ativa nos ciclos biogeoquímicos, principalmente na ciclagem de nutrientes inorgânicos como nitrogênio e fósforo, ciclagem de matéria orgânica dissolvida (DOM) e carbono, fotossíntese e depleção de oxigênio, importantes para a manutenção dos ecossistemas bentônicos (Kiran *et al.*, 2018; Pita *et al.*, 2018). Por outro lado, esses microrganismos se favorecem dos nutrientes presentes nas diferentes camadas celulares desses poríferos, sendo estes bem mais ricos em nutrientes do que a água do mar. Esse consórcio apresenta complexidade variável, contribuindo com características bioquímicas, proporcionando trocas metabólicas dentro do holobionte, além de um equilíbrio dinâmico que suporta variados tipos de adversidades (Adair e Douglas, 2017). O holobionte é controlado no âmbito da comunidade e do ecossistema, funcionando por meio de efeitos em cascata das funções fornecidas pelo microbioma da esponja (Bell, 2008).

A associação entre microrganismos e esponjas é de extrema importância, sendo estimado que cerca de 38% da biomassa desses invertebrados seja composta por uma comunidade microbiana (Vacelet, 1975). As células microbianas presentes no corpo da esponja, principalmente no mesoílo, podem estar dispostas em diferentes concentrações, dividindo as

esponjas marinhas em dois grupos: esponjas de baixa abundância microbiana (LMA, do inglês “*low microbial abundance*”) e as de alta abundância microbiana (HMA, do inglês, “*high microbial abundance*”) (Vacelet e Donadey, 1977; Hentschel *et al.*, 2003). O primeiro grupo corresponde àquelas esponjas na qual as concentrações de microrganismos associados são próximas da encontrada na água do mar circundante. Em contrapartida, as esponjas HMA excedem duas ou três ordens de magnitude a quantidade microbiana presente na água do mar, apresentando uma maior diversidade microbiana quando comparadas com as esponjas LMA. Esta dicotomia já foi sugestivamente relacionada a ter relação com diferenças morfológicas, com espécies HMA com um mesoílo mais denso e sistemas aquíferos mais complexos, compostos por canais de água mais longos e mais estreitos, levando a taxas mais baixas de filtração da água do mar (Hentschel, Usher e Taylor, 2006; Taylor *et al.*, 2007), o que foi comprovado por experimentos de mensuração de bombeamento da água do mar (Weisz, Lindquist e Martens, 2008) e microscopia eletrônica de transmissão (Gloeckner *et al.*, 2014).

As diferenças entre os microbiomas de esponjas representativas HMA (n = 19) e LMA (n = 17) (575 amostras) presentes no Projeto de Microbioma da Esponja (SMP, do inglês, “*Sponge Microbiome Project*”) (Moitinho-Silva *et al.*, 2017a) foram expostas recentemente por análises computacionais de *machine learning*. Esponjas HMA apresentavam microbiomas mais ricos e diversos do que as esponjas de LMA. Quanto à composição das comunidades microbianas associadas às esponjas, os filos Chloroflexi, Acidobacteria e Poribacteria estão enriquecidos nos espécimes de HMA e os filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes e Firmicutes foram mais abundantes nas esponjas de LMA (Moitinho-Silva *et al.*, 2017b). Ainda não é conhecido o porquê das esponjas HMA abrigarem comunidades procariontes mais uniformes e com composição mais semelhante entre si do que as esponjas LMA, e a corrente compreensão dessa dicotomia estará em constante mudança à medida que novos estudos se dedicarem à caracterização de um grupo maior de espécimes (Cleary *et al.*, 2019).

Uma importante análise em grande escala a respeito da diversidade filogenética das comunidades procarióticas associadas aos poríferos contribuiu significativamente para expansão do conhecimento a respeito do microbioma de esponjas. Foram detectados 41 filos bacterianos (abrangendo os candidatos) de 81 espécies de esponjas, tendo sido 804 amostras coletadas de diversas regiões do globo terrestre, além de 33 de sedimento e 133 amostras de água do mar. Interessantemente, em cada amostra coletada foram encontrados pelo menos 13 filos bacterianos diferentes, sendo Proteobacteria (especialmente as classes Alpha- e Gammaproteobacteria) o filo dominante em grande parte dos poríferos estudados, seguido de Chloroflexi e Cyanobacteria, e pelo filo Crenarchaeota de Archaea (Thomas *et al.*, 2016). O

perfil taxonômico dessas comunidades microbianas foi ampliado no esforço conjunto do SMP, contribuindo para confirmação do estudo anterior, organizando e fornecendo um conjunto de dados extenso e padronizado a fim de facilitar as comparações de microbiomas de esponjas em grandes escalas espaciais, temporais e ambientais (Moitinho-Silva *et al.*, 2017a). Atualmente, a diversidade de esponjas engloba todos os três domínios da vida e os grupos simbiontes bacterianos mais dominantes pertencem aos filos Proteobacteria (principalmente Gamma e Alphaproteobacteria), Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae, Cyanobacteria e o filo candidato Poribacteria, enquanto os filos Crenarchaeota e Thaumarchaeota representam os grupos dominantes do domínio Archaea (Pita *et al.*, 2018) (**Figura 4**).

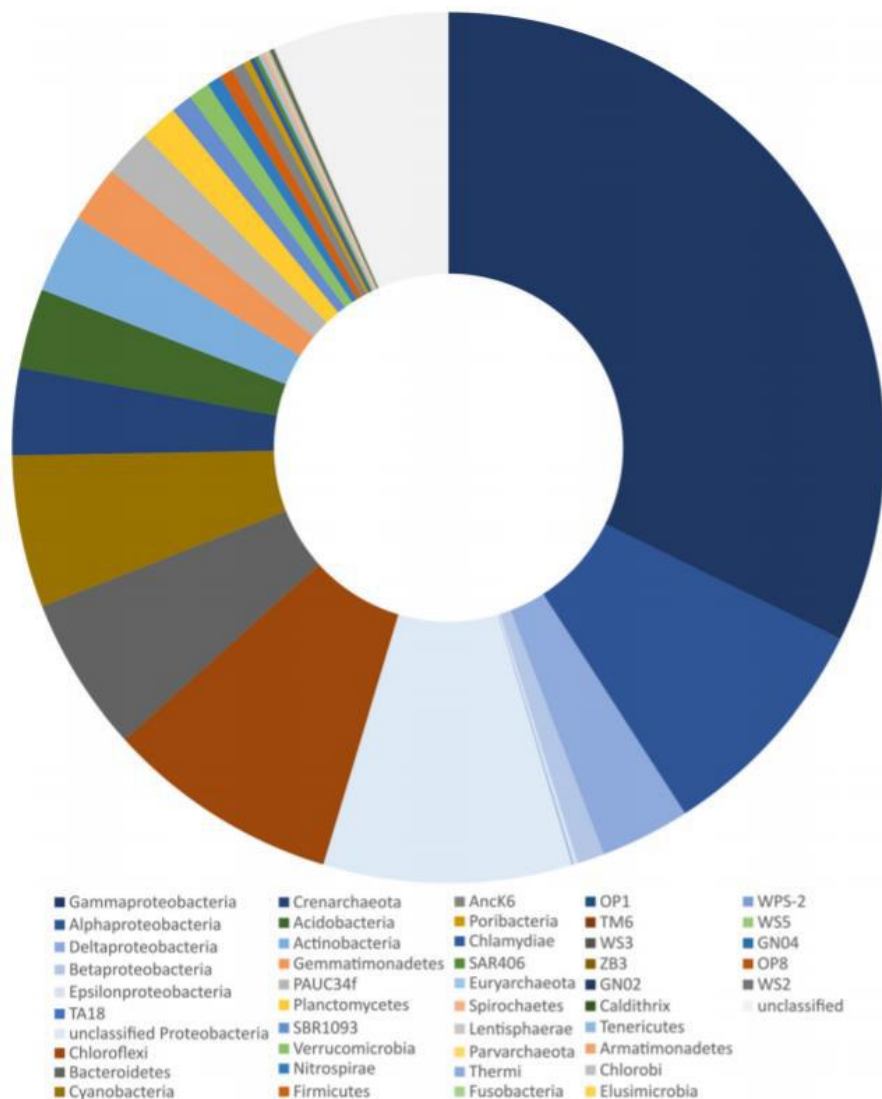


Figura 4 - Riqueza microbiana de OTU (Operational Taxonomic Unit) em comunidades associadas a esponjas em relação a filo. Perfil taxonômico do microbioma de 81 espécies diferentes de esponjas do SMP (Thomas *et al.*, 2016) obtido por meio de técnicas independentes de cultivo. Foram observados 39 filos entre os domínios Bacteria e Archaea (Adaptado de Pita *et al.*, 2018; autorização de uso no Anexo III).

1.4 Comunidades procarióticas associadas à classe *Homoscleromorpha*

Os estudos publicados a respeito da comunidade procariótica associada às espécies de esponjas da classe *Homoscleromorpha* ainda são poucos. Entre um amplo grupo de esponjas de diferentes classes, Schmitt, Hentschel e Taylor (2012) utilizaram 32 espécimes, sendo dois pertencentes às espécies *Plakina trilopha* e *Pseudocorticium jarrei* e acessaram a comunidade bacteriana presentes nessas esponjas pelo pirosequenciamento do gene codificador do 16S rRNA. A composição taxonômica detectada neste estudo compreendeu 25 filos bacterianos, sendo Proteobacteria, Chloroflexi e Poribacteria, os mais diversos em esponjas. Gloeckner e colaboradores (2013) analisaram a microbiota por DGGE e sequenciamento das bandas representativas do gene codificador 16S rRNA de diferentes espécies mediterrâneas do gênero *Oscarella* (*O. balibaloii*, *O. microlobata*, *O. tuberculata* e *O. viridis*). Os filos Actinobacteria, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes e Proteobacteria foram predominantes, sendo 76% das sequências pertencentes ao filo Proteobacteria na espécie *O. lobularis*, com sugestão de que esponjas desse gênero sejam LMA. Os dados sobre a comunidade microbiana da esponja *P. jarrei* e *Plakortis* spp. foram confirmados no trabalho global de Thomas e colaboradores (2016), com a constatação dos filos Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Deltaproteobacteria e Chrenarchaeota e Chloroflexi, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Acidobacteria e Gemmatimonadetes, respectivamente para ambas espécies.

Em relação ao conhecimento acerca da abundância microbiana dessa classe, foram realizados trabalhos que utilizaram técnicas de microscopia eletrônica (Vishnyakov e Ereskovsky, 2009). De fato, a abundância microbiana nessas esponjas foi empregada como caráter para classificação de esponjas carecendo das estruturas típicas de esqueleto, como utilizado por Boury-Esnault e colaboradores (2013), em que a comunidade simbiote foi um dos parâmetros utilizados para distinguir duas espécies de *Oscarella* entre si. Gloeckner e colaboradores (2014) também fizeram uso de microscopia eletrônica de transmissão e de fluorescência para estimar a abundância bacteriana em esponjas, classificando a esponja *O. lobularis* como LMA e duas espécies do gênero *Plakortis* foram classificadas como HMA. A abundância microbiana pode ser diferente dependendo da espécie, mesmo dentro do mesmo gênero, sendo *Plakina*, um dos menos conhecidos dentre a classe *Homoscleromorpha*, quanto a sua abundância e diversidade microbiana. Em 2015, Ruiz e colaboradores classificaram a espécie de *Plakina kanaky* como HMA, visto que todos os procariotos foram extracelulares, estando dispersos aleatoriamente no mesoólio. Por sua vez, em 2017, Ruiz e colaboradores

classificaram outras três espécies de *Plakina* (*P. crypta*, *P. endoumensis*, *P. arletensis*) como LMA também com base em microscopia eletrônica.

Poucos trabalhos se dedicaram à caracterização do microbioma cultivável de esponjas pertencentes à classe Homoscleromorpha, assim como a investigação do seu potencial biotecnológico (Laport *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019; Freitas-Silva *et al.*, 2020). Em 2017, Silva-Oliveira isolou 161 unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis de amostras pertencentes à classe Homoscleromorpha, 109 do gênero *Plakina* e 52 de *Oscarella*, em que se verificou que o gênero *Bacillus* era o predominante, seguido em menor número pelos gêneros *Micrococcus*, *Photobacterium*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Nesse estudo, as estirpes marinhas apresentaram atividade antimicrobiana frente a estirpes bacterianas gram-positivas e negativas, de origem clínica e de bancos de coleção de cultura e resistentes a diversos antimicrobianos, como *Escherichia coli* resistente à quinolonas e *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina e teicoplanina.

Outro estudo a respeito da caracterização de bactérias isoladas de esponjas da classe Homoscleromorpha, especificamente de 11 amostras do gênero *Oscarella*, coletadas em 2013 no litoral de Cabo Frio – RJ, buscou a identificação filogenética de 337 estirpes. Os filos Proteobacteria e Firmicutes predominaram na comunidade cultivável, ao passo que o gênero mais frequentemente isolado foi *Vibrio*, seguido por *Shewanella*. Em adição, essas bactérias foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana frente a estirpes clínicas e 27 apresentaram bioatividade contra pelo menos uma das amostras clínicas testadas, como *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* (Laport *et al.*, 2017).

Recentemente, Oliveira e colaboradores (2019) realizaram um estudo visando o isolamento e produção de substâncias antimicrobianas por bactérias anaeróbias associadas a quatro amostras de esponjas do gênero *Plakina* (Homoscleromorpha) da região de Cabo Frio – RJ. Um total de 34 das 60 estirpes anaeróbias estritas permaneceram viáveis, onde 82,4% foram afiliadas ao gênero *Paraclostridium*. A atividade antimicrobiana não foi verificada para nenhuma das estirpes pelo método de triagem de produção de substâncias antimicrobianas (SAM) adotado.

Os métodos dependentes de cultivo são importantes para o conhecimento das características fenotípicas dos microrganismos como morfologia, motilidade e metabolismo. Apesar da extrema relevância do cultivo microbiano, é fundamental aliar essa abordagem aos métodos independentes de cultivo, visto que é extremamente difícil reproduzir o habitat em que esses microrganismos se encontram na natureza, limitando o conhecimento acerca das demais

espécies microbianas existentes. As técnicas que não dependem do cultivo microbiano possibilitaram a elucidação de que a comunidade associada às esponjas compreende, todos os três domínios da vida (Taylor *et al.*, 2007; Simister *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016), bem como a revelação de uma alta diversidade microbiana antes não conhecida, sendo esta última tendo sido feita através do sequenciamento do 16S rRNA (Clarridge, 2004). A importância dos estudos baseados na cultura para o isolamento de representantes de novos grupos bacterianos encontrados em esponjas marinhas foi ressaltada por Laport (2018), em que trabalhos com estirpes cultiváveis facilitam o desenvolvimento de protocolos para investigar a produção de metabólitos secundários e enzimas produzidas por bactérias. Dessa forma, estudos visando a prospecção de moléculas produzidas por microrganismos associados às esponjas são de extrema relevância para o campo biotecnológico, visto que podem ser vantajosos para síntese de novas substâncias terapêuticas, bem como para diferentes áreas, com a descrição de novas enzimas para aplicação em processos industriais (Santos-Gandelman *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2016; Laport *et al.*, 2017).

1.5 Enzimas microbianas

As enzimas são catalisadores, ou seja, aceleram reações químicas, possuindo um alto grau de especificidade para seus substratos e sendo encarregadas de todas as reações fisiológicas necessárias para a vida. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, as ribozimas, todas as enzimas são proteínas. Atualmente, esses catalisadores biológicos são divididos em sete classes pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês, “*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*”): oxido-redutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5), ligases (classe 6) e translocases (classe 7) (Brahmachari, Demain e Adrio, 2017; Tipton, 2019).

A humanidade vem utilizando esses catalisadores biológicos em diversas aplicações desde os tempos pré-históricos, como na clarificação, filtração e produção de vinhos e cervejas, na panificação e fermentação do açúcar no álcool por levedura, já observado no Egito Antigo para preservação de alimentos e bebidas (Cornish-Bowden, 2011). O amaciamento de carne é um exemplo de emprego de enzimas datando do século XVIII, em que trabalhos sobre digestão gástrica da carne serviram como embasamento para futuros estudos sobre catálise enzimática, sendo essa substância ativa denominada pepsina em 1836. A hidrólise do amido em açúcar foi caracterizada no início do século XIX, através da descoberta de uma amilase vegetal, posteriormente identificada como α -amilase. Esse processo ocorre durante a germinação de

grãos e se assemelha à hidrólise química, descrita em 1815. A atividade da catalase e da peroxidase foram as primeiras atividades não hidrolíticas descritas, tendo sido reconhecidas na segunda década do século XIX, em que foi conduzido o primeiro estudo quantitativo de uma reação enzimática com a catalase (Thenard, 1819; Punekar, 2018).

O termo “catalisador” foi primeiramente definido pelo químico sueco Jöns Jakob Berzelius em 1836, sem diferenciar o fenômeno que ocorre no mundo “inanimado” do presente no “animado”, porém foi o primeiro que identificou a semelhança entre a catálise de uma reação química e a existente no interior de uma célula viva. Algumas décadas depois, em 1862, Louis Pasteur, Ferdinand Cohn e Robert Koch concluíram que a fermentação etanólica realizada pelas leveduras era catalisada por algo presente nas células, chamado de “fermentos”. O termo “enzima” só surgiu em 1876, cunhado pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne e, em 1897, o químico alemão Eduard Buchner comprovou a existência de enzimas extracelulares, demonstrando a conversão de glicose em etanol em um extrato de leveduras sem células. No entanto, a primeira enzima só foi obtida na forma purificada em 1926 pelo químico americano James Sumner, que isolou e cristalizou a enzima urease do feijão, cujo trabalho resultou em um Prêmio Nobel em Química para o mesmo em 1947 (Aehle, 2007; Brahmachari, Demain e Adrio, 2017; Punekar, 2018).

Além da maior especificidade em relação ao substrato, as enzimas podem apresentar vantagens adicionais em relação aos catalisadores químicos (sintéticos ou inorgânicos), catalisando reações químicas de maneira mais sustentável, apresentando maior eficiência em algumas condições moderadas de pH, temperatura e pressão (Gurung *et al.*, 2013). Suas características de alta seletividade e biodegradabilidade atraem a atenção para seu emprego em processos industriais, oferecendo baixa toxicidade e impacto ambiental reduzido, eliminando o uso de solventes orgânicos e, conseqüentemente, liberação dos produtos danosos gerados mediante seu emprego (Robinson, 2015; Chapman, Ismail e Dinu, 2018).

Existem diferentes fontes para descoberta de enzimas, podendo ser de origem: (i) animal, como a pepsina, uma das primeiras enzimas a serem descobertas e uma das três principais proteases no sistema digestivo humano; (ii) vegetal, como a papaína, uma enzima proteolítica vegetal encontrada naturalmente no mamão; ou (iii) microbiana. As enzimas podem ser encontradas tanto em microrganismos procarióticos, como bactérias e arqueias, quanto eucarióticos, como leveduras e fungos filamentosos. Os microrganismos são a principal fonte de enzimas industriais, visto que o número de enzimas que podem ser recuperadas economicamente de plantas e animais é limitado. Majoritariamente, esses produtores

microbianos enzimáticos foram isolados de ambientes terrestres (Souza e Magalhães, 2010; Gurung *et al.*, 2013).

Dentre as vantagens das enzimas microbianas em relação às enzimas vegetais e animais, salienta-se sua maior estabilidade, fácil manuseio, produção facilitada em larga escala e mais econômica, com diversas propriedades bioquímicas, dependendo de um menor tempo e espaço devido à sua alta consistência e fácil manipulação genética (Bull, Ward e Goodfellow, 2000; Aehle, 2007; Schafer *et al.*, 2007; Cowieson e Ravindran, 2008). Além disso, o uso industrial de enzimas microbianas está recebendo mais atenção devido à sua atividade catalítica, especificidade, não toxicidade, natureza ecológica, relação custo-benefício e qualidade (Singh, Singh, e Pandey, 2019). Cerca de 50% das enzimas utilizadas nas indústrias são obtidas de fungos, 35% de bactérias e apenas 15% de plantas e animais (Saranraj, 2014). A maioria das enzimas comercialmente relevantes foram obtidas a partir de linhagens do gênero *Bacillus*, várias espécies de *Streptomyces* e os principais fungos produtores são geralmente representados por *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* (Sanchez e Demain, 2017).

O mercado mundial de enzimas se expandiu em grande parte devido a dois fatores. Um deles foi o próprio aumento da população global, em que alguns estudos fizeram uma previsão de um crescimento de 28% na população mundial de 2015 a 2030 e o outro foi o aumento da consciência ambiental por conta dos consumidores e legislações mais rigorosas, levando a uma pressão pública e política. Isso vem levando a maior demanda de produtos e serviços gerados por uma miríade de processos industriais e, eventualmente, na implementação gradativa de enzimas na indústria (Arundel e Sawaya, 2010). Assim, esse aumento da demanda por enzimas no mercado global em todas as áreas em ritmo acelerado nos próximos anos e a atualização das aplicações enzimáticas em processos industriais levará a um maior investimento em enzimas com alto desempenho, garantido por suas características específicas, o que levará em maior comprometimento em pesquisas para exploração de novos biocatalisadores (Li *et al.*, 2012; Brahmachari, Demain e Adrio, 2017). Estima-se que em 2030, a taxa de crescimento anual de enzimas industriais esteja na faixa de 10% (Arundel e Sawaya, 2010). O valor do mercado global de enzimas industriais é estimado em US\$ 7,0 bilhões até 2023, com uma taxa composta de crescimento anual de 4,9% no período 2018-2023 (Global Markets Insights, 2020). Algumas empresas monopolizam o mercado mundial de enzimas, como a dinamarquesa Novozymes que detém uma participação estimada de 48% no mercado global de enzimas (The Novozymes Report, 2018), além das outras empresas com relevantes contribuições nessa área, tais como Koninklijke DSM NV (Holanda), DowDuPont Inc. (EUA), BASF SE (Alemanha), Advanced Enzyme Technologies Ltd. (Índia), AB Enzymes GmbH (Alemanha), Codexis, Inc. (EUA),

Amano Enzyme, Inc. (China), Hoffmann-La Roche Ltd. (Suíça) e Thermo Fisher Scientific Inc. (EUA) (Allied Market Research, 2019).

As principais aplicações das enzimas são nas indústrias de papel, têxtil, detergente, alimentos, bebidas, rações animais, biocombustíveis e farmacêutica. Nesse aspecto, alimentos, rações e bebidas representam o maior segmento com receita de quase US\$ 1,2 bilhão em 2011, com previsão anterior de crescimento para US\$ 2,0 bilhões até 2020, seguido pela indústria de detergentes, cujo mercado global foi avaliado em mais de US\$ 1,3 bilhão em 2017 (Guisan *et al.*, 2020). As hidrolases representam a maioria das enzimas industriais em atual emprego comercial, aproximadamente cerca de 75% do total, consistindo majoritariamente nas peptidases, carboidrases e lipases (Arbige, Shetty e Chotani, 2019; Li *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2013; Sajith *et al.*, 2016). Essas hidrolases são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como ilustrado na **Figura 5**. A seguir, pontuaremos aspectos fundamentais sobre as enzimas hidrolíticas que constituíram o foco do presente estudo.



Figura 5 - Panorama geral das aplicações industriais de hidrolases agarase, celulase, amilase, esterase, lipase e protease. Quadros indicam os diferentes setores industriais e asteriscos coloridos indicam qual a respectiva enzima utilizada na aplicação descrita.

O ágar consiste em uma família de heteropolissacarídeos complexos geralmente encontrado na parede celular de algas vermelhas (Rhodophyceae) dos gêneros *Gelidium* e *Gracilaria*. Esses polissacarídeos requerem vários tipos de enzimas para sua hidrólise completa nos monômeros β -D-galactopiranosose (G), 3,6-anidro- α -L-galactose (AHG), L-galactose-6-sulfato (L6S) (Yun, Yu e Kim, 2017). Em geral, as agarases são as principais encarregadas da degradação do ágar, sendo divididas em duas classes com base no padrão de clivagem: α -agarases (EC 3.2.1.158), que clivam as ligações α -1,3 e produzem agar-oligossacarídeos (AOS); e β -agarases (EC 3.2.1.81), que clivam as ligações β -1,4 e gera neoagar-oligossacarídeos (NAOs) como principais produtos. A agarose oligomérica é inicialmente clivada pela enzima α - ou β -agarase. Essa enzima cliva o ágar na ligação α - (1,3) ou β - (1,4), produzindo agarotetraose ou neoagarotetraose (NA4), respectivamente. Este sacarídeo tetramérico, como outras agaroses oligoméricas, é então decomposto em agarobiose ou neoagarobiose (NA2) através da ação da α - ou β -agarase, respectivamente. Finalmente, a agarobiose ou neoagarobiose é clivada na ligação β - (1,4) ou α - (1,3) pela β -agarobiose hidrolase ou pela α -neoagarobiose hidrolase para produzir monômeros G ou AHG, respectivamente, que são incorporados nas vias centrais de metabolismo energético (Chi, Chang e Hong, 2012). Essas enzimas são encontradas majoritariamente em fontes marinhas, particularmente bactérias isoladas da água do mar, sedimento, ou da superfície ou em associação com organismos marinhos (Li *et al.* 2007). Dentre os principais gêneros bacterianos marinhos produtores de agarase até então relatados, destacam-se *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Microbulbifer*, *Thalassomonas*, *Salegentibacter*, *Zobellia*, *Agarivorans*, *Pseudoalteromonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Acinetobacter* (Jahromi e Barzkar, 2018).

As agarases têm uma ampla variedade de aplicações, tendo sido usadas para recuperação de DNA do gel de agarose, degradação de paredes celulares, melhoria dos processos extrativos modernos a partir das algas em que o ágar é encontrado, hidrólise do ágar para produzir oligossacarídeos, os quais possuem diversas atividades fisiológicas e farmacológicas benéficas para a saúde humana (Wang *et al.*, 2004; Gurvan *et al.*, 2006). Foram reportados efeitos anti-obesidade e antidiabéticos de NAOs, em que a ingestão de uma mistura de NA4 e neoagarohexose (NA6), preparada por hidrólise enzimática do ágar comercial com a β -agarase DagA, por um longo período de 151 dias, resultou em uma redução muito significativa do ganho de peso corporal de ratos em 46,9% em comparação com o grupo com dieta tendo alto conteúdo gorduroso (Hong *et al.*, 2017). Danos a órgãos e infiltração de neutrófilos em um modelo de camundongo com choque séptico induzido por lipopolissacarídeo (LPS) foram significativamente evitados pela ingestão de NAOs, sendo estes candidatos adequados para

aplicações farmacêuticas com excelente atividade imunomoduladora (Kang *et al.*, 2017). Vários relatórios indicaram os altos valores econômicos associados aos sacarídeos derivados de ágar, incluindo NAOs, AOs e AHG, gerados pela ação de agarases. Devido às suas atividades fisiológicas e biológicas, como propriedades antioxidantes, essas moléculas têm um forte potencial para uso em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos saudáveis como aditivos de baixa caloria para melhorar as qualidades dos alimentos e bioenergia, como uma alternativa para superar as limitações dos métodos e materiais tradicionais (Fu e Kim, 2010; Park *et al.*, 2020).

Quanto às celulases, suas principais aplicações industriais incluem as indústrias têxtil, de papel e celulose, alimentos, ração animal, combustível, indústrias químicas, gerenciamento de resíduos e indústria farmacêutica (Bajaj e Mahajan, 2019). As celulases são enzimas capazes de degradar a celulose e pertencem à classe das hidrolases, sendo divididas em três grupos principais: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Wood e Garcia-Campayo, 1990; Yang *et al.*, 2013). As endoglucanases atuam hidrolisando ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando oligossacarídeos de cadeia longa (extremidades não redutoras), que são clivadas por exoglucanases ou celobiohidrolases em oligossacarídeos de cadeia curta. Existem dois tipos de exoglucanases (1,4-beta-celobiosidase), que atuam de forma unidirecional nos oligômeros de cadeia longa, desde as extremidades redutora (EC 3.2.1.176) ou não redutora (EC 3.2.1.91), liberando celobiose, que é posteriormente hidrolisada em glicose pelas β -glucosidases (Juturu e Wu, 2014; Brahmachari, Demain e Adrio, 2017). As celulases são naturalmente produzidas por uma grande diversidade de microrganismos, principalmente fungos filamentosos e bactérias isolados de solo e outros ambientes terrestres (Ma *et al.*, 2013; Quintanilla *et al.*, 2015). Os principais gêneros bacterianos produtores de celulases incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacteriodes*, *Acetivibrio*, *Rumminococcus*, *Geobacillus*, *Alteromonas* e *Vibrio* e os gêneros fúngicos incluem *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Penicillium* (Kuhad *et al.*, 2016).

A aplicação de amilases expandiu-se em muitos campos, como na química clínica, medicinal e analítica, bem como na sua tradicional aplicação na sacarificação de amido e nas indústrias têxtil, alimentícia, de fabricação de cerveja e destilados, tratamento de materiais celulósicos, couro, detergentes e indústria farmacêutica (Gupta *et al.*, 2003; Souza e Magalhães, 2010). As enzimas amilolíticas atuam na catálise da hidrólise do amido em açúcares como glicose e maltose, podendo ser α - β - γ -amilase de acordo com o tipo de ligação que são capazes de clivar. As α -amilases endo-específicas (EC.3.2.1.1) hidrolisam as ligações α -1,4 internas nas cadeias de amilose/amilopectina para produzir produtos como glicose e maltose

(Kandra, 2003) e as pululanases (3.2.1.41) atuam apenas em ligações α -1,6 das ramificações, originando maltodextrinas de cadeia linear. As amilo-glucosidases exo-específicas ou glucoamilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as cadeias amilose/amilopectina da extremidade não redutora e liberam uma unidade de glicose por vez (Sundarram e Murthy, 2014). Além dessas, existem diferentes tipos de exoamilases como β -amilases (EC 3.2.1.2) e maltotetra-hidrolases (EC 3.2.1.60) que atacam as extremidades não redutoras pela hidrólise de ligações α -1,4-glucana e liberam oligômeros de duas e quatro unidades de glicose, respectivamente (Suriya *et al.*, 2016). Em adição, a α -glucosidase (EC 3.2.1.20), uma exo-hidrolase, cliva unidades de glicose a partir da extremidade não redutora de α -1,4 de oligossacarídeos e polissacarídeos de fragmentos de amido (Isaksen, Cowieson, e Kragh, 2010). A amilase é produzida por várias bactérias, fungos e espécies geneticamente modificados de microrganismos. Dentre as espécies bacterianas, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* e várias outras espécies do gênero são amplamente utilizados para a produção comercial da enzima. As fontes fúngicas de amilase estão restritas a estirpes terrestres, principalmente a espécies de *Aspergillus* e a poucas espécies de *Penicillium*, sendo *Penicillium brunneum* uma delas (Sundarram e Murthy, 2014).

A NC-IUBMB e o MEROPS, um banco de dados que ajuda na classificação de enzimas proteolíticas e seus inibidores, recomendam o termo “peptidase” para denominar todas as proteases (McDonald, Boyce e Tipton, 2009; Rawlings *et al.*, 2018). As peptidases ocupam uma posição central em relação às suas aplicações em campos fisiológicos e comerciais, em que mais de 60% do mercado mundial de enzimas é dedicado a produção comercial dessas enzimas (Alves *et al.*, 2014; Sanchez e Demain, 2017). No geral, as peptidases são aplicadas nos setores industriais de alimentos e bebidas, laticínios, alimentação animal, de detergentes, indústria de couro, têxtil e farmacêutica (Badgujar e Mahajan, 2010). Elas agrupam um grupo grande e complexo de enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (Trincone, 2012). Assim, as peptidases são classificadas com base no tipo de ligação que catalisam, nos mecanismos químicos de catálise e na estrutura molecular e de homologia de sequência (Barrett e Rawlings, 2007). De forma ampla, no que diz respeito as reações catalisadas, as peptidases podem ser do tipo endopeptidases (EC 3.4.21-99), quando clivam em regiões internas do peptídeo ou exopeptidases (EC 3.4.11-19) (Sakamoto *et al.*, 2014). Os microrganismos contribuem com dois terços da produção comercial de peptidase. Representantes do gênero *Bacillus* são os dominantes na produção de peptidases, sendo também relatadas algumas actinobactérias, além de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* entre os principais produtores dessas hidrolases (Ellaiah, Srinivasulu e Kunamneni, 2002).

Dois grupos de hidrolases de extrema importância são as esterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico) e as lipases (Bornscheuer, 2002). As esterases são utilizadas nas indústrias têxtil, de alimentos e bebidas, de laticínios, médica e farmacêutica, de cosméticos e perfumes, por exemplo (Panda e Gowrishankar, 2005), compreendendo um grupo diverso de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ligações éster. Essas enzimas exibem alta regio-estereo especificidade, o que as tornam em atraentes biocatalisadores na produção de compostos opticamente puros na síntese química fina (Lopes *et al.*, 2011). As esterases já foram isoladas de plantas, animais e microrganismos. Já foi confirmado que a produção de esterases pode ser constitutiva ou induzível em microrganismos, destacando-se os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* e os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Rhodosporidium* (Sayali e Satpute, 2013).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são principalmente ativas contra substratos insolúveis em água, como triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases hidrolizam preferencialmente ésteres "simples" e geralmente apenas triglicerídeos compostos por ácidos graxos menores que C6 (Helistö e Korpela, 1998). Elas têm sido utilizadas em uma ampla variedade de aplicações nas áreas de farmácia, química fina, saúde geral, alimentos, cosméticos, meio ambiente e energia (Robic *et al.*, 2017). Elas pertencem à classe das serina hidrolases e catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol, diacilgliceróis, monogliceróis e ácidos graxos livres. Além disso, as lipases catalisam a hidrólise e a transesterificação de outros ésteres, bem como a síntese de ésteres e exibem propriedades enantiosseletivas (Treichel *et al.*, 2009). Geralmente, a hidrólise das ligações éster ocorre na interface entre uma fase de substrato insolúvel e a fase aquosa em que as enzimas lipolíticas permanecem dissolvidas. Na natureza, as lipases apresentam variações quanto as suas especificidades de reação. Algumas têm afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (C2, C4, C6, C8 e C10), enquanto outras têm preferência por ácidos graxos insaturados (oleico, linoleico, linolênico, etc.), e existem até mesmo aquelas que são inespecíficas e dividem aleatoriamente os ácidos graxos dos triacilgliceróis (Brahmachari, Demain e Adrio, 2017). Os avanços na biologia molecular levaram à descoberta de enzimas lipolíticas que não podem ser classificadas pelo sistema pre-existente. Utilizando métodos de comparação baseados em sequência, novas famílias foram integradas ao sistema prévio de classificação, consistindo atualmente em 35 famílias e 11 subfamílias de lipase verdadeiras (Hitch e Clavel, 2019). As lipases são onipresentes, sendo produzidas por uma variedade de organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos, destacando-se como principais produtores os fungos, como os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizomucor* *Yarrowia* e *Candida*, e as bactérias,

principalmente espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Burkholderia* (Gupta, Gupta e Rathi, 2004; Borrelli e Trono, 2015).

1.6 Enzimas microbianas marinhas

Os oceanos cobrem aproximadamente 71% da superfície da Terra, representando o maior e mais promissor reservatório aquático de biodiversidade do planeta (Zhao, 2011; Homaei, 2015; Ghanbarzadeh, Golmoradzadeh e Homaei, 2018). Os oceanos incluem os maiores extremos de luz, salinidade, temperatura e pressão, em que os habitats variam de águas tropicais rasas a trincheiras oceânicas com alta pressão, se comparado com as águas rasas (Imhoff, Labes e Wiese, 2011; Trincone, 2013). No curso da evolução, os microrganismos marinhos se adaptaram desenvolvendo capacidades metabólicas únicas para garantir a sobrevivência em diversos habitats e produzir uma variedade de metabólitos diferentes dos produtos microbianos terrestres (Jensen e Fenical, 1996; Faulkner, 2000). Esses ambientes ainda permanecem praticamente inexplorados biotecnologicamente, quando comparados com os ecossistemas terrestres (Zhang e Kim, 2010; Ambrosino *et al.*, 2019). Portanto, o ambiente marinho abriga diversas comunidades de microrganismos adaptados a diversos parâmetros ambientais, como alta concentração de sal, temperaturas extremas, pH ácido e alcalino, pressão barométrica extrema e baixa disponibilidade de nutrientes e a diversidade metabólica desses microrganismos pode ser uma fonte de enzimas capazes de atuar exclusivamente em ambientes industriais (Harrison *et al.* 2013; Ferrer *et al.*, 2019).

Essas características ecofisiológicas particulares dos microrganismos marinhos têm levado a um interesse crescente na prospecção de recursos marinhos para enzimas com aplicações em biotecnologia (Trincone, 2011; Dionisi, Lozada e Oliveira, 2012; Arnosti *et al.*, 2013). Levando em consideração que a maioria dos processos industriais são conduzidos em condições adversas, como extremos de pHs ácidos ou básicos, temperaturas baixas e/ou altas e salinidade elevada, existe um maior interesse nas chamadas “enzimas extremas” ou “extremoenzimas” (Huston, 2008; De Santi *et al.*, 2015). Arqueias, microrganismos extremófilos, bactérias marinhas, como *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Staphylothermus*, actinobactérias, fungos e microrganismos simbióticos são fontes da maioria das enzimas marinhas com novas propriedades químicas e únicas atividades biocatalíticas, algumas dessas já tendo sido utilizadas em setores industriais (Trincone, 2011; Sana, 2013; Parages *et al.*, 2016).

Várias agarases já foram isoladas de diferentes gêneros bacterianos encontrados na água do mar, sedimentos marinhos e outros ambientes, e algumas são utilizadas na indústria (Jahromi

e Barzkar, 2018). Uma *Pseudoalteromonas* sp. NJ21 isolada de sedimento na Antártica produziu uma β -agarase com a capacidade de degradar agarose em NA2 como produto final, indicando esta enzima como um candidato interessante para aplicações industriais em vários campos, incluindo cosméticos e medicamentos, devido as atividades antioxidantes dos oligossacarídeos derivados de agarases bacterianas (Jiang, 2019). A alta resistência ao sal e a detergentes de agarases também pode ser útil em aplicações industriais. Uma β -agarase proveniente da bactéria marinha *Cellulophaga algicola* DSM 14237, mostrou alta tolerância ao sal, retendo mais de 70% da atividade máxima na presença de NaCl a 2M (Han, Zhang e Yang, 2019). Outra β -agarase da bactéria agarolítica marinha *Persicobacter* sp. O CCB-QB2 mostrou maior atividade em 0,1% de SDS (do inglês, “*sodium dodecyl sulfate*”) e Triton X-100 do que na ausência de SDS (Hafizah, Thu e Furusawa, 2019). A estirpe *Acinetobacter* PS12B, isolada a partir de sedimentos marinhos, mostrou-se uma candidata produtora de uma agarase promissora. O pH e a temperatura ideais para a atividade da agarase purificada foram de 8,0 e 40°C, respectivamente. A atividade enzimática foi estimulada pela presença de íons Fe^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , enquanto os reagentes redutores (β -mercaptoetanol e ditioneitol, DTT) aumentaram sua atividade em 30-40%. A agarase purificada exibiu tolerância a detergentes e solventes orgânicos e os principais produtos de hidrólise do ágar foram NA4 e também uma mistura de oligossacarídeos mais longos NA6 e NA7. Os resíduos de alga hidrolisada pela enzima exibiram forte atividade antioxidante *in vitro*. O uso potencial da enzima é indicado para produzir hidrolisado de algas marinhas com propriedades benéficas à saúde humana, além de aplicações como a produção de biocombustíveis (Leema e Sachindra, 2018).

Além das celulasas de origem terrestre, as celulasas microbianas de ambiente marinho também demonstraram uma conversão bem-sucedida da biomassa vegetal à base de celulose em açúcar fermentável. Várias fontes microbianas marinhas foram relatadas como produtoras de celulasas, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, geram celulase, como os gêneros *Nocardiopsis*, *Alteromonas*, *Fusarium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetivibrio*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Rumminococcus*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mitococcus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aureobasidium* (Trivedi, Reddy e Lali, 2016; Barzkar e Sohail, 2020).

Exemplos de celulasas com aplicações industriais são da estirpe marinha *Bacillus* sp. OH1666, que produz uma celulase com termoestabilidade e atividade específica em ampla faixa de pH (3,0 a 9,0) e se demonstrou um agente potencial para sacarificação em etapa única da biomassa de algas marinhas (Harshvardhan, Mishra e Jha, 2013). Também foi analisada uma celulase de uma estirpe de *Pseudoalteromonas* com atividade em uma ampla faixa de pH (2,0

a 5,0) e temperatura (15 a 75°C) e concentrações de sal, com potencial para o desenvolvimento de um processo eficiente de hidrólise de biomassa, desde que a produção da enzima seja melhorada através de estratégias de biologia sintética e de sistemas (Trivedi *et al.*, 2013). A estirpe *Bacillus carboniphilus* CAS 3 isolada de sedimentos marinhos da costa indiana foi descrita por apresentar ótima atividade celulolítica com aplicação na sacarificação extensiva de palha de arroz pré-tratada (Annamalai, Rajeswari e Balasubramanian, 2014). Uma β -glucosidase de *Pseudomonas lutea* BG8, ativa na faixa de 5 a 30°C, foi relatada como adequada para diminuir o consumo de energia para a produção de bioetanol, indicada para aumentar a eficiência da sacarificação de celulose em temperatura baixa (Tiwari *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2020). A endoglucanase Bc22Cel tolerante ao sal secretada pela estirpe *Bacillus* sp. SR22, exibiu ampla resistência à pH e temperatura, com valores ótimos de 6,5 e 60°C, respectivamente. Bc22Cel ainda demonstrou uma propriedade halofílica considerável, sendo capaz de manter mais de 70% de sua atividade residual, mesmo quando pré-incubada com NaCl a 1,5 M por 1h. Portanto, Bc22Cel foi sugerida como uma endoglucanase candidata potencial e útil para aplicações industriais, como a bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em seus derivados (Dos Santos *et al.*, 2018).

Atividade sob baixas temperaturas, tolerância ao sal, pH e termoestabilidade de amilases específicas de diferentes espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras marinhas são características interessantes para várias indústrias. As principais fontes para a produção de α -amilase são variadas espécies de *Bacillus* e de β -amilase são alguns microrganismos como *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* sp. e *Rhizopus japonicus* (Suriya *et al.*, 2016; Trincone, 2018). Um exemplo de aplicação biotecnológica desta enzima é na produção do pululano, um polissacarídeo composto de unidades de maltotriose produzida por *Aureobasidium pullulans*. No estudo, a α -amilase marinha adaptada a frio produzida por *E. coli* BL21/pEtac-amy derivada de *Pseudoalteromonas arctica* GS230 marinha foi usada para hidrolisar o amido a partir de batata crua e os produtos da hidrólise foram usados para produção de pululano por uma cepa marinha de *Auerobasidium*. Pela flexibilidade de suas unidades interligadas de maltotriose, o pululano possui propriedades interessantes na produção de filmes transparentes finos, resistência a óleo e impermeabilidade ao oxigênio, além de sua importante utilização nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (Wu *et al.*, 2016).

A amilase HP664 produzida pela bactéria marinha *Catenovolum* sp. O X3, demonstrou-se ativa de 20 a 50°C e possui tolerância a álcalis e solventes, propriedades especialmente interessantes para produção de biocombustíveis a partir de amido. Após sua expressão

heteróloga, a enzima recombinante foi aplicada na produção de bio-hidrogênio e foi obtido um rendimento de 119,08 mL/g de hidrolisado de amido, 3,73 vezes superior ao controle sem o tratamento com HP664, através da fermentação por espécies de *Clostridium* (Wu *et al.*, 2017). Essas características também foram verificadas em uma amilase alcalofílica proveniente de *Luteimonas abyssi*, uma bactéria isolada de sedimento, que foi capaz de manter sua atividade sem cálcio, uma característica favorável na indústria de detergentes (Song *et al.*, 2016). Uma nova α -amilase (AmyZ1) foi descoberta em uma bactéria isolada em alta profundidade, *Pontibacillus* sp. ZY. Quando expressa em *E. coli*, AmyZ1 mostrou alta atividade nas faixas de pH 6,0-7,5 e temperatura de 25-50°C. Seu pH e temperatura ótimos foram 7,0 e 35°C, respectivamente. Semelhante à maioria das α -amilases, a atividade de AmyZ1 foi aumentada (2,4 vezes) em 1,0 mM de Ca^{2+} . A atividade específica de AmyZ1 em relação ao amido de arroz cru foi de 12.621 ± 196 U/mg, muito maior do que outras hidrolases de amido cru relatadas. Além disso, ao hidrolisar o amido de milho cru usando a combinação de AmyZ1 e glucoamilase comercial, a taxa de hidrólise atingiu 75% após 4,5 h de reação, notavelmente mais alta que a obtida nas indústrias de processamento de amido (Fang *et al.*, 2019).

Alguns microrganismos marinhos como *Streptomyces fungicidicus*, espécies de *Bacillus*, *Pyrococcus furiosus* e *Thermococcus*, são mais descritos como produtores de peptidases (Barzkar *et al.*, 2018). A peptidase do hipertermófilo marinho *Staphylothermus marinus* é patenteada (WO1991019791A1, 1991), tendo um pH ótimo na faixa alcalina e temperatura ideal de 95°C (Antranikian e Klingenberg, 1990). Além disso, também é relatado o uso de enzimas proteolíticas partir de bactérias hipertermofílicas, como *P. furiosus* ou *Thermococcus* na formulação de detergentes (Antranikian e Klingenberg, 1995; Kelly *et al.*, 1995; Trincone, 2012). Atualmente, as enzimas fibrinolíticas consistem em um alvo interessante na área de biocatalisadores terapêuticos. Nesse contexto, com o objetivo de produzir uma enzima viável e econômica a partir de uma potencial actinobactéria, uma peptidase fibrinolítica foi purificada a partir de *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1 isolada de sedimento. As condições ideais de cultivo para a produção de peptidase fibrinolítica foram com glicerol, farelo de soja, pH 7,2 e uma temperatura de 37°C (Verma *et al.*, 2018).

Uma nova peptidase marinha psicrófila foi encontrada a partir de uma bactéria marinha *Flavobacterium* YS-80 no Mar Amarelo, na costa oeste chinesa. A peptidase purificada a partir da estirpe selvagem sob condições otimizadas de fermentação apresentou características que conferiam uma estrutura total estável e menos flexível, resultando em maior estabilidade térmica (Zhang *et al.*, 2011). Uma peptidase alcalina extracelular produzida pela estirpe marinha *Pseudoalteromonas* sp. 129-1 foi purificada e manteve atividade e estabilidade

consideráveis em uma ampla faixa de temperatura de 10 a 60°C e faixa de pH de 6,0 a 11,0, e a atividade ótima foi detectada na temperatura de 50°C e pH 8,0. O inibidor da metaloprotease (EDTA, do inglês “*ethylenediaminetetraacetic acid*”) não teve efeito inibitório na atividade da peptidase, mesmo em concentrações de até 15 mM, enquanto o PMSF (do inglês, “*phenylmethylsulfonyl fluoride*”), um inibidor comum da serina protease, inativou consideravelmente a enzima. Foi observada alta estabilidade da peptidase na presença de surfactantes (SDS, Tween 80 e Triton X-100), agente oxidante (H₂O₂) e detergentes comerciais. Além disso, a peptidase foi tolerante a maioria dos solventes orgânicos testados e solução salina em até 30%. Curiosamente, o biofilme de *P. aeruginosa* PAO1 foi bastante reduzido em 0,01 mg/mL da peptidase e quase completamente dissolvido em concentração de 1,0 mg/mL. Coletivamente, a peptidase de *Pseudoalteromonas* sp. 129-1 se mostrou interessante como aditivo em detergente para a roupa e agente anti-biofilme não tóxico (Wu *et al.*, 2015b).

Dentre os microrganismos marinhos produtores de esterase, chamam a atenção *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*. As enzimas lipolíticas com características físico-químicas únicas estão ganhando mais destaque por sua imensa importância industrial. Uma nova enzima lipolítica foi clonada e expressada a partir de uma biblioteca genômica preparada a partir da bactéria marinha *Psychrobacter pacificensis*. A esterase recombinante, Est11, foi capaz de hidrolisar ésteres de cadeia curta (C2 a C8) e exibiu uma atividade ótima contra o éster butirato (C4), temperatura e pH ótimos foram de 25 a 30°C e 7,5, respectivamente. Est11 apresentou mais de 70% de atividade residual a 10°C, sugerindo que era uma esterase ativa a frio. A enzima era altamente ativa e estável em alta concentração de NaCl (5 M) e a incubação com etanol, isopropanol, propanodiol, dimetilsulfoxido (DMSO), acetonitrila e glicerol produziu efeitos positivos notáveis na atividade da enzima. Essa nova enzima com propriedades como adaptabilidade ao frio, tolerância ao sal e a solventes orgânicos é uma potencial candidata para atender às necessidades de diversos processos industriais (Wu *et al.*, 2015a).

Outra esterase microbiana marinha de *Pseudomonas oryzihabitans* HUP022 isolada de grandes profundidades no Oceano Pacífico exibiu uma tolerância muito boa a maioria dos solventes orgânicos, surfactantes e íons metálicos testados. Essa esterase microbiana de mar profundo é um biocatalisador com excelente potencial na síntese assimétrica nas indústrias química e farmacêutica e poderia ser um substituto aos métodos tradicionais que causam poluição ao meio ambiente (Wang *et al.*, 2016). Uma nova esterase ativa em baixas temperaturas, EstLiu, foi clonada a partir da bactéria marinha *Zunongwangia profunda*, expressada em *E. coli* BL21 (DE3) e purificada, exibiu ampla especificidade de substrato com a maior atividade hidrolítica contra butirato de *p*-nitrofenil (C4). A atividade ótima da enzima

foi em pH 8,0 e a 30°C, com boa termoestabilidade e inativação acelerada acima de 60°C. EstLiu exibiu uma atividade residual impressionante de 75% a 0°C e manteve atividade residual também frente a 50% (v/v) de etanol, isopropanol, DMSO e etileno glicol, bem como na presença de Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 (Rahman *et al.*, 2016).

Várias lipases de bactérias marinhas já foram descritas, possuindo tolerância ao sal, pH levemente ácido/alcalino e baixa temperatura (Treichel *et al.*, 2009; Sathishkumar *et al.*, 2015). Os principais fungos e bactérias marinhos produtores de lipase pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* (Javed *et al.*, 2018). Uma lipase de *Pseudomonas otitidis* isolada de sedimento marinho apresentou uma atividade específica de 5647 U/mL (usando azeite de oliva como substrato), e apresentou atividade residual em pH 5,0-9,0, em uma faixa de temperaturas entre 30°C e 80°C, e na presença de solventes orgânicos não polares (Navvabi *et al.*, 2018). Um total de 20 isolados bacterianos marinhos foram obtidos do Mar Mediterrâneo e foram pesquisados quanto à produção de lipases. Todas as estirpes apresentaram capacidade lipolítica e a produtora mais promissora foi identificada como *B. cereus* HSS. Os fatores mais significativos que afetaram a produção da lipase foram as concentrações de FeSO₄, KCl e concentrações de óleo (óleo de sésamo, óleo de milho, azeite, óleo de palma, óleo de coco e óleo de semente de algodão). A imobilização por adsorção em suporte esponjoso aumentou a atividade da lipase em 2,8 vezes em comparação com as células livres. Foi realizado um teste para o tratamento econômico de águas residuais oleosas e as eficiências de remoção da demanda biológica de oxigênio, sólidos totais em suspensão e óleo e graxa foram 87,63, 90 e 94,7%, respectivamente, sendo promissor para aplicações futuras no tratamento de esgoto (Hassan, Abd El Latif e Ali, 2018). A lipase recombinante de *Colwellia psychrerythraea*, uma bactéria psicrófila, exibiu temperatura e pH ideais de atividade a 25°C e pH 7,0, respectivamente, retendo mais de 80% da atividade entre 5°C e 15°C. Essas características foram consideradas promissoras para o tratamento de águas residuais com altas concentrações de lipídeos, pois a temperatura da drenagem de águas residuais é relativamente baixa (Watanabe *et al.*, 2002).

1.7 Enzimas do microbioma de esponjas

Conforme dito anteriormente, o vasto repertório enzimático dos diversos membros das comunidades microbianas que habitam o holobionte das esponjas chama atenção pelas suas características de adaptação ao ambiente marinho, como halotolerância e atividade ótima na faixa alcalina, que são valorizadas para utilização em diferentes setores industriais. Segundo a última revisão sobre os biocatalizadores industriais do microbioma de esponjas (Oliveira *et al.*,

2020b), a classe das hidrolases é a mais predominantemente investigada, seguidas pelas oxidoredutases. Da classe das hidrolases, as glicosídeo hidrolases (GHs) e as carboxilesterases representam unidas aproximadamente 63% dos estudos relatados, seguidas das peptidases (18%) e estudos em que várias atividades exoenzimáticas (12%) foram detectadas, em sua maioria após apenas triagem em meio sólido. Considerando a afiliação taxonômica dos produtores microbianos, o domínio Bacteria é o mais investigado (66%), seguido pelos fungos (25%) e Archaea (9%). O filo Proteobacteria abriga os principais produtores bacterianos, predominantemente membros da classe Gammaproteobacteria, seguida pelo filo Actinobacteria, com a maioria pertencendo ao gênero *Streptomyces*, e o filo Firmicutes, todos membros da família Bacillaceae. Em relação aos fungos, Ascomycota é o filo dominante, envolvendo principalmente os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cadophora* e *Penicillium*. Em relação às arqueas, elas são predominantemente pertencentes ao filo Euryarchaeota (Malik e Furtado, 2019a, b; Gaonkar e Furtado, 2018, 2020), seguido do filo Thaumarchaeota (Schleper *et al.*, 1997).

As enzimas hidrolíticas pesquisadas no presente estudo produzidas por microrganismos isolados de outras esponjas marinhas descritas até o momento estão organizadas na **Tabela 1**, e os principais exemplos serão discutidos a seguir, atentando-se para aqueles em que as enzimas foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente.

Alguns dos principais membros bacterianos encontrados no microbioma de esponjas, destacando as classes Alpha-, Gammaproteobacteria (Proteobacteria) e Flavobacteria (Bacteroidetes), são conhecidos produtores de agarases caracterizadas bioquimicamente (Jahromi e Barzkar, 2018). Somente duas exoagarases derivadas de esponja foram relatadas, das estirpes *Cytophaga* (Imhoff e Stöhr, 2003) e *Bacillus* (Li *et al.*, 2007), ambas observadas após a triagem em meio sólido. Sequências gênicas putativas de β -agarases (família GH50), α - (famílias GH5 e GH36) e β -galactosidases (família GH2), α -L-fucosidases (família GH95) foram detectadas em genomas de amplificação única (SAGs, do inglês, “*single amplified genomes*”) do filo candidato "Poribacteria", ainda considerado um modelo de simbionte microbiano de esponja (Kamke *et al.*, 2013; Podell *et al.*, 2019). O isolamento, a identificação e a caracterização bioquímica das polissacaridases marinhas do consórcio microbiano de esponjas devem receber mais atenção tendo em vista a diversidade de aplicações industriais que essas hidrolases apresentam (Trincone, 2018).

A bactéria *Marinobacter* sp. (MSI032) isolada da esponja marinha *Dendrilla nigra* (Demospongiae) foi otimizada para a produção de carboximetilcelulase (CMCase) por fermentação submersa e a enzima foi purificada até 12,5 vezes com um rendimento de 37% e

uma atividade específica de 2.548,75 U/mg. A enzima purificada exibiu atividade máxima na temperatura mesofílica (27 – 35°C) e em ampla faixa de pH com atividade ótima em pH 9,0 e permaneceu estável mesmo a um pH alcalino superior a 12,0 (Shanmughapriya *et al.*, 2009). Uma haloarquea produtora de celulase, a estirpe *Haloferax sulfurifontis* GUMFAZ2, foi isolada de *Haliclona* sp. (Homoscleromorpha), uma esponja marinha coletada na região rochosa entre marés de Anjuna, Goa (Índia). A cultura microbiana produziu celulase extracelular com uma atividade máxima de 11,7 U/mL, usando carboximetilcelulose-Na (CMC-Na), como única fonte de carbono em meio contendo NaCl 3,5 M, pH 7,0 a 40°C e gerou celobiose e glicose, detectáveis por cromatografia em camada fina (CCD). Ao contrário das celulases convencionais, essa enzima é ativa na presença de NaCl a 5M e não possui atividade de xilanase associada, podendo ser considerada como celulase livre de xilanase, em que essas celulases consideradas “xylanase-free” são mais vantajosas por possuírem atividade em temperaturas mais elevadas e em condições alcalinas, podendo ser aplicadas no biobranqueamento da celulose e na indústria do papel, como alternativas ao uso de compostos clorados tóxicos, realizando a degradação seletiva da matriz de hemicelulose, aumentando o brilho do papel e resultando em uma dissolução melhor da celulose e conseqüentemente reduzindo os riscos de doenças ambientais gerados pelos halogênios orgânicos adsorvíveis liberados no tratamento convencional (Walia *et al.* 2017; Malik e Furtado, 2019b).

Uma bactéria endossimbionte *Halobacterium salinarum* MMD047, isolada da esponja marinha *Fasciospongia pyriformis* (Demospongiae), coletada na costa peninsular da Índia foi relatada por produzir eficientemente amilase. A produção máxima de enzima foi obtida em meio mínimo suplementado com sacarose a 1% e verificou-se que a enzima foi produzida constitutivamente mesmo na ausência de amido. A temperatura e o pH ótimos para a produção da enzima foram de 40°C e 8,0, respectivamente e a enzima purificada exibiu atividade máxima na faixa de pH de 6,0 a 10,0 com um pH ótimo de 9,0. A enzima foi estável a 40°C e sua atividade diminuiu drasticamente acima de 50°C. A enzima foi caracterizada como amilase alcalina, podendo ter potenciais aplicações para hidrolisar o amido sob condições de pH alto na indústria têxtil e como ingrediente em detergentes para máquinas de lavar louça e lavanderia automáticas (Shanmughapriya *et al.*, 2009). Uma estirpe amilolítica de *Streptomyces* sp. SBU3 isolada da esponja *Ircinia* sp. (Demospongiae) da Costa do Cabo Comorin (Índia) também foi descrita. O meio de produção da amilase foi suplementado com 1% de NaCl (m/v) e induziu a produção máxima da enzima (200 IU/mL). No entanto, a concentração de NaCl >2% (m/v) promoveu o decaimento gradualmente e retardou a atividade enzimática da amilase. A produção

ótima de α -amilase foi a 30°C (100 IU/mL) e pH 7,5 (95 IU/mL) (Krishnakumar, Bai e Premkumar, 2015).

A maioria das lipases e esterases microbianas caracterizadas do microbioma de esponjas possuem pelo menos três ou mais características de adaptação ao habitat, como alcalifilia, halotolerância e estabilidade a agentes surfactantes e solventes orgânicos. A lipase purificada da *Pseudomonas* sp. MSI057 associada a esponja *D. nigra* teve sua atividade relativa aumentada em aproximadamente um terço em baixas concentrações de detergentes, incluindo Triton-X e SDS, sendo bem estável sob extração de acetona, além de apresentar uma natureza alcalina e psicrófila (Kiran *et al.*, 2008). Uma lipase alcalina também foi identificada na estirpe *B. pumilus* B106, isolado da esponja *Topsentia rugosa* (Homoscleromorpha) do mar da China Meridional (Zhang *et al.*, 2009), com atividade sob uma temperatura ótima de 50°C, estável em altas concentrações de sal, mantendo 78% de atividade de 0 a 150% psu de KCl, e induzível na presença de 10% de metanol. Uma nova lipase halotolerante foi identificada após a triagem de uma biblioteca metagenômica de *Haliclona simulans* (Homoscleromorpha) (Selvin *et al.*, 2012), exibindo atividade em ampla faixa de pH e termotolerância, associada a uma halotolerância de 99% de atividade retida em até 5 M de NaCl. Essa atividade também foi influenciada de forma positiva por detergentes e solventes orgânicos, revelando-se um biocatalisador com potencial emprego na indústria.

Duas esterases recombinantes, denominadas EstB1 e EstB2, foram isoladas após uma extensa triagem de uma biblioteca genômica de uma estirpe de *Bacillus* sp. associada a *Aplysina aerophoba* (Homoscleromorpha) (Karpushova *et al.*, 2005). Ambas as esterases hidrolisantes de ácidos graxos de cadeia curta diferiram em sua classificação baseada em sequência de aminoácidos, refletindo em algumas diferenças nas propriedades bioquímicas: EstB1 sendo levemente termofílica, ao passo que EstB2 exibiu mais características mesofílicas. Apesar das semelhanças em termos de afinidade do substrato, inibição por íons metálicos e estabilidade na presença de solventes orgânicos (estabilidade de até 50% do DMSO), EstB1 demonstrou uma tolerância ao NaCl e KCl relativamente mais alta que EstB2. Em outro estudo, uma nova esterase foi isolada do metagenoma da esponja de profundidade *Stelletta normani* (Demospongiae). Seu caráter levemente alcalifílico, em combinação com a halotolerância, reatividade aos íons metálicos e psicrófilia salientaram seu potencial emprego em processos de baixa temperatura como fabricação de alimentos, produtos farmacêuticos termolábeis e detergentes estáveis a baixas temperaturas (Borchert *et al.*, 2017). Outra triagem de uma biblioteca metagenômica de *Hyrtilos erecta* (Demospongiae) usando Tween 20 e CaCl₂ como formulação de substrato resultou na detecção de um gene codificador de esterase, *estHE1*

(Okamura *et al.*, 2010). A proteína EstH1 purificada apresentou especificidade para ácidos graxos > C6 e manteve sua atividade entre 25 e 55°C. Também atingiu 55% de sua atividade a 40°C após 12 h, termoestabilidade interessante para uso em instalações industriais que necessitam de armazenamento por longos períodos de tempo. Além disso, o que mais chamou a atenção foi seu comportamento sob concentrações crescentes de NaCl, em que até 1,9 M, a atividade enzimática reduziu constantemente, mas uma sutil recuperação ocorreu quando a concentração de NaCl foi ajustada para 3,8 M.

Muitas das peptidases descobertas a partir de estudos de microbiomas de esponja exibem propriedades bioquímicas equivalentes às proteases industriais anteriormente relatadas, como resistência a temperaturas elevadas e meios à base de solvente orgânico (Barzkar *et al.*, 2018). Uma peptidase termotolerante e alcalina foi purificada de uma potencial estirpe gelatinolítica de *Roseobacter* isolada da esponja marinha *Fasciospongia cavernosa* (Demospongiae) e apresentou atividade residual de quase 92,5% e 89% de sua atividade sob pH 9,0 e a 50°C, respectivamente (Shanmughapriya *et al.*, 2008). A atividade proteolítica foi confirmada no extrato bruto de uma estirpe halofílica de *Halococcus* sp. GUGFAWS-3, isolada de espécimes de *Haliclona* da costa indiana após cultivo em meio líquido suplementado com NaCl a 25% (Gaonkar e Furtado, 2018) e foi subsequentemente caracterizada como uma extremozima (Gaonkar e Furtado, 2020). As extremozimas são muito resistentes a condições extremas, possuindo propriedades extraordinárias como adaptabilidade ao frio e halo e termoestabilidade, sendo comumente isoladas de microrganismos extremófilos.

As bactérias derivadas de esponjas marinhas também têm sido a fonte de enzimas proteolíticas com aplicações biomédicas. Uma peptidase fibrinolítica foi isolada de uma estirpe de *Streptomyces radiopugnans* de esponjas tubulares marrons *Agelas conifera* (Demospongiae) altamente caseinolítica e, além da capacidade de degradação do plasminogênio da caseína, sendo capaz de liberar os glóbulos vermelhos com maior eficiência do que o medicamento estreptoquinase, destacando sua utilidade como agente trombolítico para distúrbios cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio e derrames (Dhamodharan *et al.*, 2019).

A pesquisa por enzimas produzidas por microrganismos isolados de esponjas ainda está incipiente, mesmo com seu notório potencial industrial revelado pelos exemplos aqui apresentados. Os microrganismos que habitam esse holobionte certamente produzem enzimas das mais variadas classes, as quais, pelas suas características de adaptação ao habitat similar ao que é encontrado em todas os biocatalisadores marinhos, podem ser ativas em pHs ácidos ou básicos, temperaturas extremamente baixas e altas e salinidade elevada. Isso favorece seu emprego em uma miríade de processos industriais que majoritariamente ocorrem nessas

condições adversas ou extremas. Assim, salientando-se a diversidade de aplicações industriais que essas enzimas podem ter e o fato de que algumas espécies de esponjas que abrigam membros microbianos simbiotes produtores de biomoléculas com características únicas são endêmicas do litoral brasileiro e pouco exploradas, o investimento em estudos voltados para exploração do holobionte porífero sob múltiplas potencialidades biotecnológicas se faz extremamente relevante e promissor.

Tabela 1 - Conhecimento atual sobre o potencial biocatalítico de hidrolases do microbioma de esponjas.

Enzimas	Status	Fonte	Classificação taxonomica (Domínio)	Esponja(s)		Resultados relevantes	Referência
				Gênero ou espécie (Classe)	Localização geográfica (país)		
Amilase	Purificada	Fungo cultivável	<i>Mucor</i> sp. (Eukarya)	<i>Spirastrella</i> sp. (Demospongiae)	Ilha Havelock (Índia)	pH ótimo de 5,0 e temperatura ideal de 60°C	Mohapatra, Banerjee e Bapuji (1998)
Amilase, celulase e protease	Extrato bruto	Bactérias cultiváveis	Vários gêneros (Bacteria)	Vários gêneros (Demospongiae)	Baía de Bengala (Índia)	Altas atividades (> 0,5 UI/mL) das três enzimas em estirpes dos gêneros <i>Alcaligenes</i> e <i>Bacillus</i> .	Mohapatra, Bapuji e Sree (2003)
Protease, lipase, quitinase, agarase	Triagem em meio sólido	Bactérias cultiváveis	Vários gêneros (Bacteria)	<i>Stelletta tenui</i> , <i>Halichondria rugosa</i> e <i>Dysidea avara</i> (Demospongiae)	Ilha Sanya (China)	Alguns isolados exibiram múltiplas atividades enzimáticas e a estirpe J-1 de <i>Bacillus cereus</i> mostrou altas atividades de protease e lipase.	Li <i>et al.</i> (2007)
Protease	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Roseobacter</i> sp. MMD040 (Bacteria)	<i>Fasciospongia cavernosa</i> (Demospongiae)	Vizhinjam (Índia)	A temperatura e o pH ótimos para a produção da enzima foram 37°C e 7,0, respectivamente.	Shanmughapriya <i>et al.</i> (2008)
Lipase	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Pseudomonas</i> sp. MSI057 (Bacteria)	<i>Dendrilla nigra</i> (Demospongiae)	Vizhinjam (Índia)	A atividade da enzima purificada foi ótima a 37°C e mostrou 80% de atividade a 20°C. O pH ideal foi 9,0.	Kiran <i>et al.</i> (2008)
Lipase	Extrato bruto	Bactéria cultivável	<i>Bacillus pumilus</i> B106 (Bacteria)	<i>H. rugosa</i> (Demospongiae)	Ilha Sanya (China)	Esta lipase mostrou tolerância a alta salinidade (150% psu), pH (8,0) e temperatura (50°C).	Zhang e Kim (2010)
Amilase	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Halobacillus halophilus</i> MMD047 (Bacteria)	<i>F. cavernosa</i> (Demospongiae)	Vizhinjam (Índia)	A temperatura e o pH ótimos para a produção da enzima foram de 40°C e 8,0, respectivamente.	Shanmughapriya <i>et al.</i> (2009)
Amilase, protease, gelatinase, DNase, lipase, fosfatase, urease	Triagem em meio sólido	Bactéria cultivável	Vibrionales – principalmente (Bacteria)	<i>Dysidea granulosa</i> e <i>Haliclona fibulata</i> (Demospongiae)	Lagoa da ilha de Kavaratti (Índia)	Quase 50% das bactérias associadas à esponja expressaram múltiplas atividades enzimáticas (> 4,0)	Feby e Nair (2010)

Celulase	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Marinobacter</i> sp. MSI032 (Bacteria)	<i>D. nigra</i> (Demospongiae)	Vizhinjam (Índia)	A enzima purificada teve atividade ótima a pH 9,0 e permaneceu estável mesmo a um pH > 12,0	Shanmughapriya <i>et al.</i> (2010)
Esterase	Purificada	Metagenoma	Não identificado (Bacteria)	<i>Hyrtios erecta</i> (Demospongiae)	Ilha Ishigaki (Japão)	EstHE1 possui a termoestabilidade e a halotolerância ao necessárias para uso como enzima industrial	Okamura <i>et al.</i> (2010)
Lipase	Triagem em meio sólido	Metagenoma	<i>Methylobacter</i> sp. (Bacteria)	<i>Cymbastela concentrica</i> (Demospongiae)	Ilha nua (Austrália)	Três proteínas produziram atividades hidrolíticas/lipolíticas e conferiram propriedades antibacterianas a hospedeira <i>E. coli</i> .	Yung <i>et al.</i> (2010)
Celulase	Extrato bruto	Fungos cultiváveis	Vários isolados de fungos (Eukarya)	<i>Latrunculia corticata</i> (Demospongiae)	Sharm El-Sheikh de Mar Vermelho (Egito)	Uma estirpe recombinante Tahrir-25 superproduziu celulases (exo-β-1,4-glucanase, endo-β-1,4-glucanase e β-1,4-glucosidase)	El-Bondkly e El-Gendy (2012)
Lipase	Purificada	Metagenoma	Não identificado (Bacteria)	<i>H. simulans</i> (Demospongiae)	Costa oeste (Irlanda)	A atividade máxima de 2.700 U/mg foi observada com palmitato de <i>p</i> -nitrofenil 10 mM como substrato, na presença de Ca ²⁺ e NaCl 5 mM em uma reação de 15 min a pH 7,0 e 40°C	Selvin <i>et al.</i> (2012)
Lipase, protease e xilanase	Extrato bruto	Fungos cultiváveis	Vários isolados de fungos (Eukarya)	Não informado	Base Comandante Ferraz Antártico Brasileiro (Antártica)	46,39, 37,11 e 14,43% das leveduras avaliadas foram capazes de produzir lipase (a 15°C), xilanase (a 15°C) e protease (a 25°C), respectivamente.	Duarte <i>et al.</i> (2013)
Lipase	Purificada	Metagenoma	Não identificado (Bacteria)	<i>Ircinia</i> sp. (Demospongiae)	Ilha Yongxing (China)	LipA foi ativa em ampla faixa alcalina, com atividade ótima em pH 9,0, e alto nível de estabilidade	Su <i>et al.</i> (2015)

Amilase	Extrato bruto	Bactéria cultivável	<i>Streptomyces</i> sp. SBU3 (Bacteria)	<i>Ircinia</i> sp. (Demospongiae)	Costa do Cabo Comorin (Índia)	em uma faixa de pH de 7,0 a 12,0. A produção ótima de α -amilase foi observada em pH 7,5 a 30°C por 96h.	Krishnakumar, Bai e Premkumar (2015)
Celulases	Extrato bruto	Fungo cultivável	<i>A. sydowii</i> CBMAI 934 e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (Eukarya)	<i>C. erecta</i> (Demospongiae)	Região de São Sebastião (Brasil)	Atividades de 0,73, 1,9, 2,4 e 1,3 FPU/g (de substrato) para <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, <i>A. sydowii</i> CBMAI 934, respectivamente.	Santos <i>et al.</i> (2017)
Esterase	Purificada	Metagenoma	Não identificado (Bacteria)	<i>Stelletta normani</i> (Demospongiae)	Costa oeste (Irlanda)	A esterase recombinante mostrou-se mais ativa em pH 8,0 e exibiu tolerância ao sal em uma ampla faixa de concentrações.	Borchert <i>et al.</i> (2017)
Celulase, xilanase e peroxidase/fenol oxidase	Parcialmente purificada	Fungo cultivável	<i>Cadophora</i> sp. TS2, <i>Emericellopsis</i> sp. TS11 e <i>Pseudogymnoascus</i> sp. TS12 (Eukarya)	<i>S. normani</i> (Demospongiae)	Atlântico Norte Oceano (Irlanda)	As atividades de CMCase e xilanase, exibiram valores ótimos de temperatura e pH entre 50 - 70°C e pH 5,0 - 8,0, respectivamente, junto com boa termostabilidade e halotolerância.	Batista-García <i>et al.</i> (2017)
Amilase, celulase, protease	Triagem em meio sólido	Bactéria cultivável	Vários gêneros (Bacteria)	<i>Aplysina fulva</i> , <i>A. viridis</i> and <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Demospongiae)	Costa do Rio de Janeiro (Brasil)	Uma estirpe isolada de <i>H. heliophila</i> (Hh9) foi capaz de degradar os três substratos	Araújo <i>et al.</i> (2017)
Amilase, celulase, lipase e protease	Triagem em meio sólido	Bactéria cultivável	Gammaproteobacteria e Firmicutes – maioria (Bacteria)	<i>Pione vastifica</i> e <i>Siphonochalina siphonella</i> (Demospongiae)	Jeddah (Mar Vermelho)	Alta proporção de bactérias produtoras de lipase (n = 22, 58%), enquanto as bactérias produtoras de protease (n = 7, 18%) e amilase (n = 3, 8%) foram mais baixas, e todas as estirpes foram negativas para a produção de celulase.	Bibi <i>et al.</i> (2018)
Lipase e protease	Extrato bruto	Arqueas cultiváveis	<i>Halococcus</i>	<i>Haliclona</i> sp. (Demospongiae)	Ajuna (Índia)	A estirpe produziu simultaneamente 49,5	Gaonkar e Furtado (2018)

			<i>agarilyticus</i> GUGFAWS-3 (Archaea)			U/mL de protease extracelular e 3,67 U/mL de lipase extracelular, na presença de NaCl a 25%. O pH e a temperatura ideais para a produção de protease fibrinolítica foram 7,0 e 33°C, respectivamente.	
Protease	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Streptomyces radiopugnans</i> VITSD8 (Bacteria)	<i>Agelas conifera</i> (Demospongiae)	Costa do mar de Rameshwaram (India)		Dhamodharan <i>et al.</i> (2019);
Celulase	Extrato bruto	Arquea cultivável	<i>Haloferax sulfurifontis</i> (Archaea)	<i>Haliclona</i> sp. (Demospongiae)	Anjuna (India)	A celulase bruta apresentou uma atividade ótima de 11,7 U/mL, na concentração de NaCl a 20%, pH 7,0 e 40°C.	Malik e Furtado (2019b)
Amilase	Triagem em meio sólido	Fungo cultivável	<i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. (Eukarya)	Não informado	Floresta de mangue de Mangkang (Indonésia)	Entre os oito fungos estudados, apenas três produziram amilase extracelular.	Sibero <i>et al.</i> (2019)
Protease	Purificada	Bactéria cultivável	<i>Halococcus</i> sp. GUGFAWS-3 (Archaea)	<i>Haliclona</i> sp. (Demospongiae)	Anjuna (India)	A atividade ideal foi a 70°C, NaCl 3 M e pH 7,0 e foi estável na presença de solventes orgânicos polares e não polares, detergentes e hidrocarbonetos.	Gaonkar e Furtado (2020)
Celulase, lacase	Extrato bruto/ Abordagem molecular/- ômica	Bactéria cultivável	<i>Pseudomonas luteola</i> 20578 (Bacteria)	Vários gêneros (Demospongiae)	Ilha de Seribu Jacarta (Indonésia)	A bactéria produtora de lacase foi identificada como produtora de proteína da família de oxidases multicobre.	Maharsiwi <i>et al.</i> (2020)

2 JUSTIFICATIVA

O sucesso da relação simbiótica microrganismo-esponja vem sendo explorado ativamente sob o âmbito biotecnológico, constituindo um dos principais campos de estudo na microbiologia de esponjas. Todavia, a maior parte das pesquisas ainda se concentra no isolamento e caracterização de substâncias antimicrobianas produzidas pelos microrganismos associados às esponjas marinhas. Considerando o vasto repertório enzimático dos mais diversos membros das comunidades microbianas nesse holobionte, salienta-se a imprescindibilidade de acessar esses biocatalisadores sob a perspectiva de seu uso industrial. Nos poucos casos em que enzimas de microrganismos isolados de diferentes espécimes de esponjas foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente, notou-se a presença de duas ou mais características de adaptação ao ambiente, tais como halotolerância e atividade ótima na faixa alcalina (Oliveira *et al.*, 2020b). Essas propriedades bioquímicas são comumente verificadas em enzimas marinhas e são valorizadas para utilização nas condições extremas em que se operam reações industriais. Com a devida atenção voltada ao viés industrial, certamente novos biocatalisadores serão descobertos com sucesso nesses simbioses microbianos, não se restringindo a confirmação de sua atividade, mas indo além, até a comprovação de seu emprego prático nos setores de interesse.

Considerando-se que Homoscleromorpha é uma classe recém-estabelecida (Gazave *et al.*, 2012), com crescente caracterização de novas espécies e em constante revisão taxonômica, o conhecimento em microbiologia dessas esponjas ainda está em seu início, especialmente no que concerne às comunidades microbianas cultiváveis. Faz-se crucial salientar que as abordagens dependentes de cultivo ainda são de extrema relevância para descoberta e elucidação de novos metabólitos derivados dessas interações estabelecidas no holobionte porífero (Laport, 2018). Dessa forma, o presente trabalho se fundamentou na seleção de bactérias produtores de hidrolases de interesse biotecnológico isoladas do microbioma bacteriano cultivável associado a espécimes da esponja *P. cyanorosea*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a produção de hidrolases por bactérias isoladas da esponja marinha *P. cyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha).

3.2 Objetivos específicos

1. Isolar bactérias do microbioma da esponja marinha *P. cyanorosea*;
2. Realizar a triagem da atividade das hidrolases agarase, amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase das bactérias isoladas da esponja marinha *P. cyanorosea*;
3. Selecionar e identificar as estirpes bacterianas potenciais produtoras das enzimas anteriormente avaliadas em meio sólido;
4. Avaliar a estabilidade da produção de agarase pelas potenciais estirpes bacterianas produtoras em meio sólido frente a diferentes faixas de temperatura e pH;
5. Realizar a triagem da produção de β -glicosidase em meio sólido com as potenciais estirpes bacterianas celulolíticas;
6. Produzir o extrato bruto enzimático das hidrolases que tiveram maiores Índices Enzimáticos;
7. Determinar a atividade do extrato bruto enzimático das hidrolases que tiveram maiores Índices Enzimáticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e processamento das esponjas e isolamento bacteriano

Um total de cinco amostras da esponja *P. cyanorosea* foram coletadas da região da “Poça de Maré do Carolina” no litoral da cidade de Cabo Frio (RJ) (22°53’14”S-42°00’18”W), situada a 160 km da cidade do Rio de Janeiro (RJ) em maio de 2017. As coletas foram realizadas sob a coordenação do Prof. Dr. Guilherme Muricy (MN/UFRJ). Imediatamente após a coleta, os fragmentos foram lavados com água do mar esterilizada, para retirada da microbiota transiente da superfície do animal e do restante do substrato e armazenadas sob refrigeração. No laboratório, as amostras coletadas foram processadas sob condições assépticas para o isolamento bacteriano, conforme Marinho e colaboradores (2009). Os meios de cultura empregados para o isolamento bacteriano foram: BHI (do inglês, “*Brain Heart Infusion*”, não-diluído e diluído 1:10), Marine (não-diluído e diluído 1:10) e Gauze I (Atlas, 2010). Na fase de isolamento, todos os meios foram suplementados com anfotericina B (Sigma-Aldrich) (1,0 µg/mL) com o intuito de inibir o crescimento de fungos. O meio Gauze I também foi acrescido de ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich) (25 µg/mL), a fim de evitar o crescimento de bactérias gram-negativas de crescimento rápido, para facilitação da recuperação de actinobactérias marinhas.

Depois das sementeiras nos meios citados anteriormente, as culturas bacterianas foram incubadas a temperatura ambiente (25°C ± 3) por um período de até sete dias, para as bactérias heterotróficas em geral, e até 28 dias para as actinobactérias. Foi feito o exame diário do crescimento e morfologia das colônias bacterianas. As unidades formadoras de colônias (UFCs) selecionadas de acordo com as características morfológicas foram purificadas e estocadas nos caldos dos mesmos meios de cultivo em que foram originalmente isoladas, acrescidos de 20% (m/v) de glicerol para o estoque a -20°C. Os morfotipos bacterianos isolados receberam uma nomenclatura por meio de uma sigla de acordo com a fonte de sua origem (esponja ou larva), o meio em que foram recuperadas e a ordem de isolamento da UFC. À título de exemplo, a estirpe bacteriana “PA2MD11” foi isolada de *P. cyanorosea* (“P”), esponja adulta (“A”), segundo indivíduo (“2”), do meio de isolamento Marine 1:10 (“Marine Diluído”), consistindo na décima primeira UFC recuperada nesse meio (“11”).

4.2 Triagem da produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico

As bactérias foram reativadas nos caldos dos mesmos meios utilizados no isolamento e após 24 – 72 horas, das que permaneceram viáveis, aproximadamente 10⁷

células de cada estirpe isolada (10 µL) foram semeadas de modo a se obter um crescimento puntiforme (*spot*) nos meios descritos na **Tabela 2** (composição detalhada no Anexo I). Após 96 - 120 h de incubação a 25°C, as leituras dos resultados foram conduzidas especificamente para cada meio de triagem, com o cálculo de Índice Enzimático [IE = tamanho da zona de hidrólise (mm)/tamanho da massa puntiforme bacteriana (mm)]. Um potencial produtor da exoenzima foi considerado como sendo aquele com o valor de IE igual ou maior que 2,0 (Hankin e Anagnostakis, 1975). Os experimentos descritos acima foram realizados em triplicata, porém as triplicatas foram fechadas apenas para as bactérias que foram positivas em uma primeira rodada de testes.

Para todas as polissacaridases (agarase, amilase e celulase), a revelação foi feita através da adição de solução de lugol (KI₃) fraco a uma concentração de 3,3g/L. A visualização de um resultado positivo consistiu no aparecimento de um halo claro de degradação do substrato polissacarídico em contraste com um meio escurecido, representando pelo polissacarídeo não hidrolisado e em complexo com as moléculas de iodo do lugol. Para esterase e lipase, um resultado positivo foi configurado pela formação de halos de precipitação de CaCl₂ com os subprodutos de hidrólise liberados pelas enzimas lipolíticas. Para peptidase, o surgimento de um halo de degradação claro confirmou a atividade proteolítica sobre a caseína do leite desnatado, substrato empregado nesse meio de triagem.

Tabela 2 - Lista de meios de culturas sólidos utilizados para a triagem da produção das exoenzimas hidrolíticas das bactérias isoladas de *P. cyanorosea*.

Hidrolase investigada	Meio de cultura de triagem	Referência
Agarase	Meio de Hu	Hu <i>et al.</i> , 2008
Amilase	Ágar Nutriente suplementado com amido a 0,2% e Meio A1 (DSMZ Medium 1054)	Hankin e Anagnostakis, 1975; Atlas, 2010
Celulase	Ágar Carboximetilcelulose (CMC)	Kasana <i>et al.</i> , 2008
Esterase	Meio de Sierra acrescido de Tween 20 a 1,0% (m/v)	Sierra, 1957
Lipase	Meio de Sierra acrescido de Tween 80 a 1,0% (m/v)	
Protease	Ágar Leite Desnatado	Atlas, 2010

DSMZ (do alemão, “*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*”): Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares. 1. Dois meios diferentes foram empregados para a triagem de amilase: Ágar Nutriente suplementado com amido a 0,2% para as bactérias isoladas dos meios BHI e BHI 1:10 e o Meio A1 para as bactérias isoladas nos meios Marine, Marine 1:10 e Gauze I.

4.3 Identificação molecular das estirpes potenciais produtoras de exoenzimas

Subsequentemente à triagem da produção de hidrolases em meio sólido, as bactérias isoladas de *P. cyanorosea* com maiores valores de IE foram selecionadas para a identificação com base na amplificação e sequenciamento do gene *rrs*, codificador do

16S rRNA. A extração do DNA total bacteriano foi realizada por lise térmica das colônias e a amplificação do gene *rrs* por reação em cadeia da polimerase (PCR), ambos conforme previamente descritos por Laport e colaboradores (2017). Os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTGTTAACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991) foram utilizados para essa etapa. Após a eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), os produtos de PCR com tamanhos de ~ 1,4 kb foram enviados para o serviço de sequenciamento pelo método de Sanger (Biotecnologia Pesquisa e Inovação, BPI, Botucatu, SP) com o emprego do iniciador 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') (Huse *et al.*, 2008). As sequências obtidas foram averiguadas quanto à sua qualidade no software Sequence Scanner 2.0 (AppliedBiosystems) e, em seguida, submetidas à pesquisa pela ferramenta SINA do banco de dados do SILVA (<https://www.arb-silva.de/aligner/>) para afiliação filogenética. As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/>).

4.4 Estabilidade da produção de agarase total em meio sólido sob diferentes temperaturas e pH

A verificação da estabilidade da produção da agarase em meio sólido frente à diferentes temperaturas e faixas de pH foi conduzida em meio de Hu (Hu *et al.*, 2008). Assim, um total de 10 µL de cultivo prévio (24 - 48h) em caldo Marine (pré-inóculo) das bactérias selecionadas foi semeado em *spot* na superfície do meio de Hu. Consecutivamente à incubação e crescimento bacteriano, foi conduzida a revelação do teste conforme descrito anteriormente (Tópico 4.2), com o cálculo do IE. A termoestabilidade foi verificada pela incubação da estirpe bacteriana selecionada à 10°C, 18°C, 25°C, 28°C, 37°C, 45°C e 56°C. Quanto à estabilidade a acidez ou alcalinidade do meio, o pH do meio de Hu foi ajustado para as faixas de pH de 5,0 a 11,0 com HCl (1,0 M) ou NaOH (1,0 M). Para avaliação do efeito do pH, a incubação foi tanto a 28°C quanto a 37°C. Para ambas as condições (temperatura e pH), as estirpes foram incubadas por uma semana, com a revelação realizada apenas após final desse período. Esses experimentos foram todos feitos em triplicata para maior confiabilidade e o resultado se deu pelo cálculo da média da triplicata dos valores de IEs encontrados para cada parâmetro.

4.5 Triagem da produção de β -glicosidase em meio sólido

Com finalidade de confirmação da geração das enzimas envolvidas na degradação completa da celulose, as potenciais bactérias quanto à produção de celulase total em Ágar CMC (Kasana *et al.*, 2008; Anexo I) foram avaliadas qualitativamente quanto à produção de β -glicosidases. Inicialmente, as estirpes foram crescidas em caldo Marine por 24 - 48 h a 25°C e, então, semeadas de modo puntiforme (10 μ L) em meio basal com esculina como substrato essencial, em triplicata (Atlas, 2010; Anexo I). Seguidamente à uma incubação por 48 h a 72 h, a atividade foi detectada quanto à formação de halos enegrecidos em torno dos *spots* de crescimento bacteriano. O princípio do teste está na geração de esculetina, o principal produto de hidrólise da esculina pela β -glicosidase, a qual se precipita com os íons férricos originando complexos moleculares com pigmentação escura (Pointing, 1999), visíveis macroscopicamente ao redor do crescimento puntiforme das bactérias testadas.

4.6 Produção do extrato bruto enzimático de agarase e celulase

Para a produção da agarase e celulase extracelular foram testados uma miríade de meios líquidos para fermentação submersa para adaptação das condições utilizadas nos artigos de caracterização de outras agarases e celulases, principalmente isoladas de habitats marinhos, até que se encontrasse aquele que a atividade enzimática fosse detectada (Anexo I). Alíquotas de 50 μ L do pré-inóculo bacteriano foram adicionadas em 50 mL desse meio de produção em Erlenmeyers de 250 mL. Esses frascos foram mantidos sob agitação a 130 rpm a 28°C por até 72 h. As culturas foram, então, centrifugadas à 13.600 \times g por 30 min a 4°C e o sobrenadante livre de células recuperado foi tratado como extrato enzimático bruto. A fim de se averiguar a manutenção da atividade enzimática do extrato bruto recém-preparado, foram feitos poços nos mesmos meios sólidos aplicados na triagem das respectivas polissacaridasas e 10 μ L do mesmo foi aliquotado, com a revelação conduzida conforme previamente detalhado.

4.7 Quantificação da atividade de agarase e celulase do extrato bruto enzimático

A atividade de agarase e de carboximetilcelulase (CMCase) do extrato bruto foi determinada pela dosagem de açúcares redutores liberados com o reativo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O reagente de ácido dinitrosalicílico para a determinação de açúcares redutores é composto de ácido dinitrosalicílico, “sal de Rochelle” (tartarato de sódio), bissulfito de sódio e hidróxido de sódio. O “sal de Rochelle” é introduzido para

impedir que o reagente dissolva oxigênio. A alcalinidade (hidróxido de sódio) é necessária para a ação redutora da glicose no DNS. O DNS, por sua vez, é um composto amarelado em solução que pode ser reduzido por açúcares redutores a um composto nitroamino análogo, ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, que possui coloração avermelhada, ao mesmo tempo em que os açúcares redutores são oxidados. Este composto é aromático, assim como o DNS, mas absorve luz facilmente. Por isso, é possível estabelecer uma relação direta entre a quantidade de açúcares redutores presente na solução com a medida colorimétrica realizada em espectrofotômetro (quantidade de DNS reduzido). Quanto mais avermelhada é a solução resultante, maior é a concentração de açúcares redutores na amostra inicial (Miller, 1959).

A estirpe bacteriana produtora da polissacaridase foi cultivada em caldo Marine (3,0 mL/tubo) a 28°C, 130 rpm por 24 - 48 h, seguido do inóculo de 50 µL desta cultura fresca em 50 mL do meio de produção, previamente preparados em Erlenmeyer. Para a produção do extrato enzimático bruto de agarase foi adotado o meio de produção mínimo otimizado (Fu *et al.*, 2009; Anexo I). Para a produção do extrato enzimático bruto de celulase foi adotado o meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 3,0% (m/v) de NaCl e 1,0% (m/v) de CMC (Anexo I). Seguidamente ao inóculo, os Erlenmeyers foram incubados a 28°C a 130 rpm por 48-120 h.

A solução de substrato para o ensaio de agarase foi composta de 0,2% (m/v) de ágar dissolvido em PBS (do inglês, “*phosphate buffered saline*”) 1X (pH 7,4) (Anexo II). Para atividade de CMCase, a solução de substrato usada foi composta de 1,0% (m/v) de CMC dissolvida em tampão fosfato de sódio a 10 mM (pH 7,4) (Anexo II). Alíquotas de 1,0 mL do meio de produção inoculado com a estirpe bacteriana foram transferidas para microtubos de 2,0 mL, e estes foram centrifugados à 13.600 xg por 30 min a 4°C. Os tubos foram mantidos sob baixa temperatura (4°C) até a adição do extrato bruto enzimático na etapa de determinação da atividade enzimática.

Cinco tubos de vidro de 20 mL (previamente esterilizados) foram organizados para compor o sistema de reação da atividade enzimática, sendo utilizados dois controles: um branco para reagente, com água destilada esterilizada ao invés do extrato bruto, e um branco para enzima, no qual a adição do extrato bruto se deu apenas depois da reação enzimática ter ocorrido nos tubos-teste e imediatamente anterior a inativação enzimática a 92°C. Um total de 900 µL de solução de substrato (ágar a 0,2%, m/v, pH 7,4) e 100 µL do extrato bruto enzimático foram adicionados aos tubos e estes foram incubados a 37°C

por 45 min para o ensaio de atividade de agarase. Para o ensaio de determinação da atividade celulolítica, alíquotas de 500 μ L de solução de substrato (1,0% CMC, pH 7,4) e 500 μ L da extrato bruto enzimático foram adicionados e os tubos foram incubados a 50°C por 30 min. Após o tempo de incubação, foram adicionados 1,0 mL de DNS a cada tubo e os mesmos foram aquecidos a 92°C por 10 min. Finalmente, os tubos foram colocados em um banho de gelo, a fim de permitir que esfriem, por três minutos e o volume de cada tudo foi completado com 8,0 mL de água destilada esterilizada, seguido de sua homogeneização em vórtex. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm (UV-1800, Shimadzu Corporation, Japão). Ambos ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicata para cada estirpe testada.

Curvas-padrão (calibração) de D-galactose e D-glucose foram previamente preparadas para o cálculo da atividade enzimática dos extratos brutos de agarase e celulase, respectivamente. Uma unidade de atividade de cada polissacaridase avaliada (agarase/CMCase) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol dos respectivos açúcares redutores (D-galactose ou D-glucose) por min sob as condições do ensaio supracitadas.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento bacteriano

Um total de 628 bactérias foi isolado nos meios BHI (19), BHI 1:10 (15), Marine (242), Marine 1:10 (109) e Gauze I (243) a partir de cinco espécimes da esponja *P. cyanorosea*. Dessas, 305 bactérias isoladas permaneceram viáveis após a reativação do estoque e, então, foram submetidas ao rastreamento da produção de exoenzimas hidrolíticas em meio sólido.

5.2 Triagem da produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico

O resultado positivo para atividade das polissacaridasas (agarase, amilase e celulase total) se caracterizou pela formação de um halo de degradação ao redor da colônia bacteriana puntiforme, mais claro do que o restante do meio, que ficou escurecido pela solução de lugol aplicada para revelação. Em relação à esterase e lipase, foi possível observar a formação dos halos de precipitação de CaCl_2 , que contrastam com o meio mais claro e translúcido. Por fim, no que diz respeito à confirmação de atividade proteolítica pelas estirpes testadas, foram visualizados os halos de degradação mais claros do que o meio de triagem utilizado.

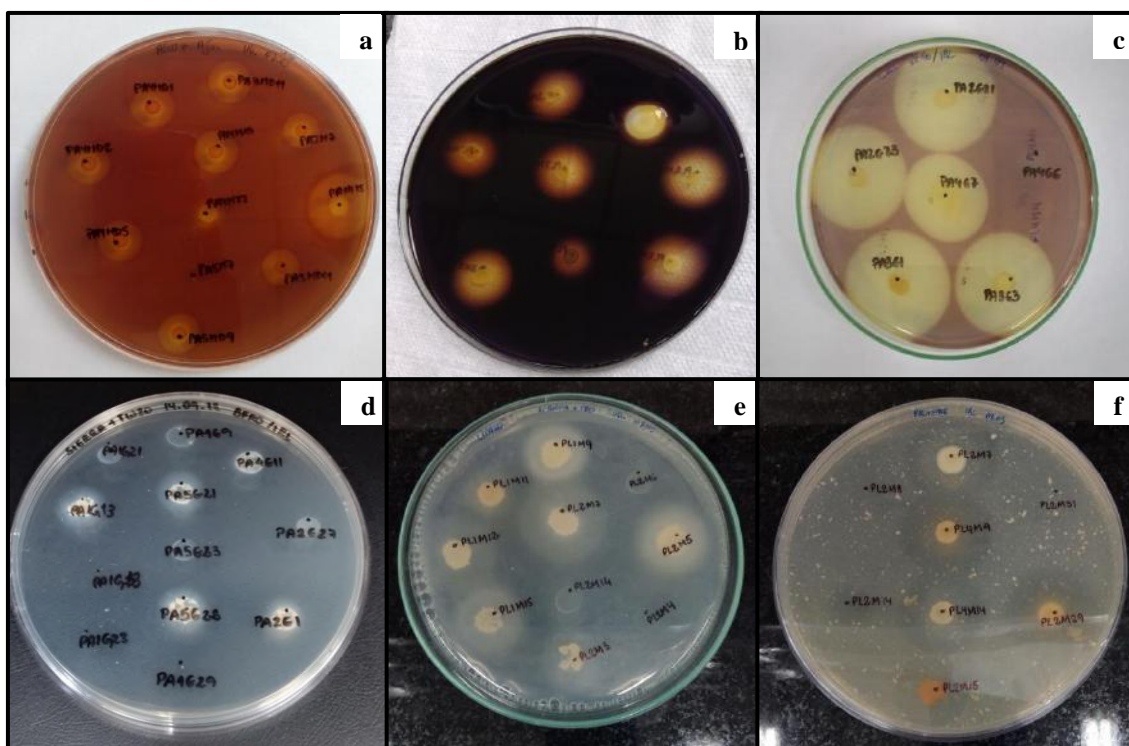


Figura 6: Placas representativas dos resultados de triagem da produção de exoenzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico das bactérias isoladas de *P. cyanorosea*. Placa correspondente à enzima triada: agarase (a), amilase (b), celulase (c), esterase (d), lipase (e) e peptidase (f).

Um conjunto de 22 bactérias foram pré-selecionadas no momento do isolamento em meio Marine, pois causavam uma notória depressão visível no ágar. Logo, das 19 estirpes que permaneceram viáveis e que foram utilizadas na triagem de agarose em meio sólido, 17 foram positivas no teste. Assim, pôde ser feita uma associação entre a depressão causada no meio sólido com a possível capacidade de degradação do ágar, agente de solidificação de meios de cultura microbiológicos. As demais bactérias foram selecionadas com base nas que mantinham sua viabilidade no meio de cultivo após reativação do estoque, resultando em diferentes conjuntos de bactérias testadas para cada grupo enzimático. Infelizmente, nem todas as bactérias foram capazes de crescer nos meios utilizados para triagem, resultando na redução do número de bactérias testadas quando comparado ao número das pré-selecionadas. Tal redução também ocorreu no momento de fechar as triplicatas testadas para cada bactéria, tendo em vista que algumas morreram ao longo dos 12 meses de realização dos experimentos. Primeiramente, as bactérias que permaneciam viáveis e cresciam no meio de triagem enzimática eram triadas e com as positivas, era fechada a triplicata. Vale reforçar que não haviam recursos o suficiente para realizar o fechamento da triplicata em uma única rodada, além de nem todo meio de triagem ser compatível com as necessidades fisiológicas da bactéria isolada da esponja. Sendo assim, a **Tabela 3** é um compilado geral dos dados obtidos na triagem da produção das seis exoenzimas hidrolíticas das bactérias isoladas de *P. cyanorosea*, de acordo com os meios de cultura usados no isolamento.

Tabela 3: Testes de triagem da produção de exoenzimas hidrolíticas das bactérias isoladas de *P. cyanorosea* de acordo com os meios de cultura usados no isolamento.

Meio de isolamento	Hidrolase de interesse	Total de bactérias pré-selecionadas	Total de bactérias com crescimento positivo no meio de triagem	Porcentagem das bactérias com atividade (%)	Total de bactérias com atividade com triplicata fechada	Porcentagem de bactérias com atividade com triplicata com IE \geq 2,0 (%)
Marine	Agarase	22	19	89,5	17	94
	Amilase	78	30	38,4	23	91
	Celulase	78	35	44,9	32	100
	Esterase	78	50	65	37	60
	Lipase	78	40	54	9	100
	Peptidase	78	16	20,5	4	100
Marine Diluído (1:10)	Amilase	75	75	28	21	57,1
	Celulase	75	74	91,9	68	48,5
	Esterase	31	31	90,3	28	39,3
	Lipase	28	28	60,7	17	5,9
	Peptidase	68	67	64,2	19	73,7
Gauze I	Amilase	106	81	55,5	31	45,2
	Celulase	133	124	91	95	93,7
	Esterase	128	97	89,7	67	50,7
	Lipase	128	100	66	31	25,8
	Peptidase	128	103	60,2	48	56,2
BHI	Amilase	6	6	0	0	0
	Celulase	6	6	66,7	4	25
	Esterase	1	1	100	1	0
	Lipase	1	1	100	1	0
	Peptidase	4	4	75	3	33,3
BHI Diluído (1:10)	Amilase	13	13	7,7	1	0
	Celulase	13	13	46,1	6	33,3
	Esterase	1	1	0	0	0
	Lipase	1	1	0	0	0
	Peptidase	13	13	69,2	9	66,7

IE: Índice Enzimático.

Os meios de triagem adotados possibilitaram a efetiva detecção de bactérias isoladas de *P. cyanorosea* produtoras das hidrolases de interesse. No presente estudo, 19 bactérias isoladas foram avaliadas em meio sólido quanto à produção de agarases, 205 para amilases, 252 para celulasas, 180 para esterases, 170 para lipases e 203 para peptidases (**Tabela 4**). Dentre as bactérias testadas, das que tiveram sua triplicata fechada, ou seja, apresentaram atividade enzimática em três placas distintas, 17 (89,5%) produziram agarases, 79 (38,5%) foram produtoras de amilases, 205 (81,7%) apresentaram atividade celulásica. Um conjunto de 149 (82,8%) produziram esterases, 106 (62,3%) apresentaram atividade lipásica e 120 (59,1%) foram produtoras de peptidases. Do total analisado, 66,7% dos IEs foram iguais ou superiores a 2,0.

Tabela 4: Resultados dos testes de triagem para cada exoenzima hidrolítica testada das bactérias isoladas de *P. cyanorosea*.

Hidrolase de interesse	Total de bactérias testadas	Porcentagem das bactérias com Atividade (%)	Total de bactérias com atividade com triplicata fechada	Porcentagem de bactérias com atividade com triplicata com IE ≥ 2 (%)
Agarase	19	89,5	17	94
Amilase	205	38,5	76	61,8
Celulase	252	81,7	205	87,8
Esterase	180	82,8	133	50,4
Lipase	170	62,3	58	32,7
Peptidase	203	59,1	83	62,6

IE: Índice Enzimático.

Ao total, 207 estirpes foram positivas para dois ou mais dos cinco grupos enzimáticos analisados (amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase) (**Figura 7**). Dessas, 73 (35,3%) apresentaram atividade para duas hidrolases, 65 (31,4%) para três grupos enzimáticos e 55 (26,6%) para quatro diferentes enzimas hidrolíticas. Além disso, 14 estirpes (6,7%) apresentaram resultado positivo para esses cinco grupos de hidrolases pesquisados.

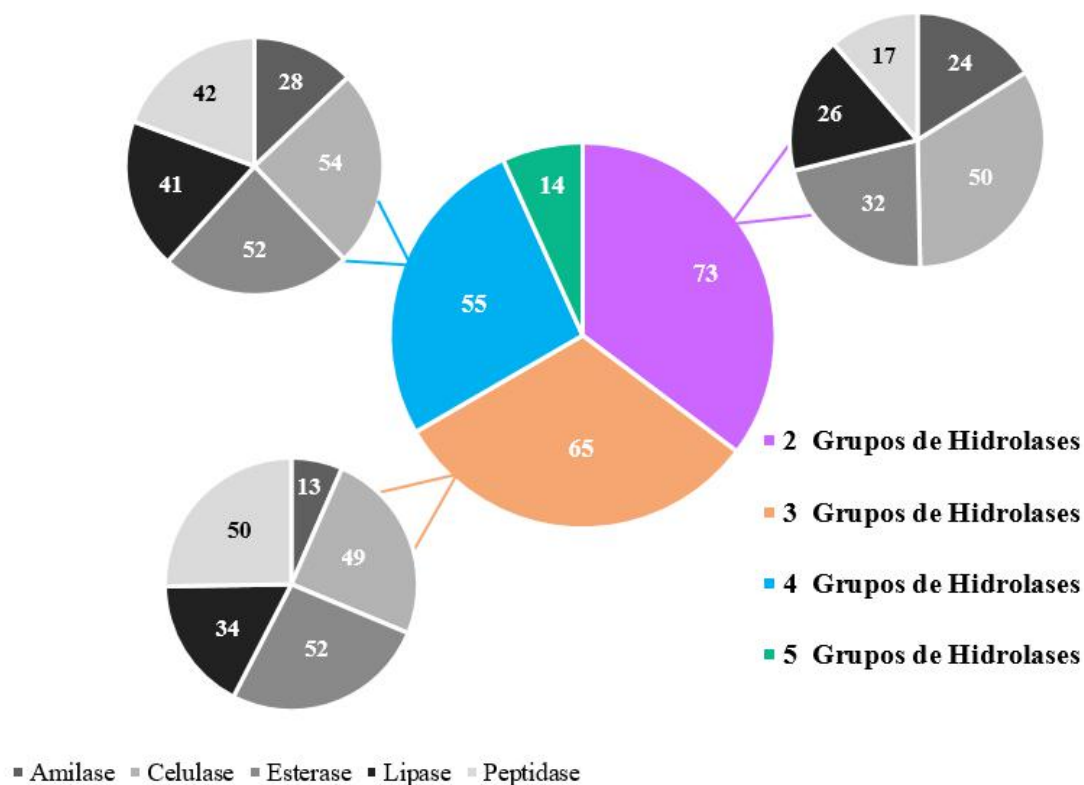


Figura 7: Gráfico de setores com o número de estirpes isoladas de *P. cyanorosea* ($n = 207$) com atividade positiva para dois ou mais grupos das cinco hidrolases testadas (amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase). Gráficos menores representam o número de estirpes positivas para cada grupo enzimático em cada grupo.

Quatro estirpes foram selecionadas por apresentarem os maiores índices enzimáticos: duas agarolíticas – PA2MD8 e PA2MD11 – e duas celulolíticas – PA3G1 e PL1G11 – consideradas como potenciais produtoras de ambas polissacaridasas. Como apresentado nos itens seguintes, estas estirpes foram identificadas e seguiram para os testes de caracterização enzimática e de produção e investigação da atividade enzimática em meio líquido. Os grupos enzimáticos agarase e celulase foram escolhidos para as próximas etapas do trabalho devido aos seguintes fatores: (a) os maiores IEs foram observados nos meios sólidos para produção de celulases da coleção bacteriana isolada de *P. cyanorosea* (conforme demonstrado na **Figura 6**); (b) existem poucos relatos na literatura de bactérias isoladas de esponjas marinhas produtoras de agarase e celulase; e (c) os produtos de hidrólise gerados pela ação das agarases apresentam altíssimo valor agregado com diversas atividades farmacológicas de interesse.

5.3 Identificação molecular das estirpes potenciais produtoras de exoenzimas

Para sua identificação molecular, os produtos de amplificação com cerca de 1,4 kb do gene *rrs*, codificador da subunidade 16S ribossomal, das potenciais bactérias produtoras de agarases e celulases foram submetidos ao sequenciamento. Deste modo, as estirpes foram classificadas taxonomicamente nos gêneros *Bacillus* (PA2MD8), *Pseudoalteromonas* (PA2MD11) e *Vibrio* (PA3G1 e PL1G11) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Afiliação taxonômica por análise das sequências do gene *rrs* (16S rRNA) das bactérias isoladas de *P. cyanorosea* consideradas como potenciais produtoras enzimáticas.

Enzimas	Identificação da estirpe	Afiliação taxonômica	Número de Acesso no GenBank
agarase	PA2MD8	<i>Bacillus</i> sp.	MN794233.1
	PA2MD11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	MN794234.1
celulase	PA3G1	<i>Vibrio</i> sp.	MN794190.1
	PL1G11	<i>Vibrio</i> sp.	MN794189.1

5.4 Estabilidade da produção de agarase total em meio sólido sob diferentes temperaturas e pH

As estirpes *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 foram analisadas quanto à estabilidade da produção da agarase em meio sólido (Meio de Hu) frente à diferentes temperaturas e faixas de pH. Após 7 dias de incubação à 10°C, 18°C, 25°C, 28°C, 37°C, 45°C e 56°C para acesso preliminar da termoestabilidade, o maior valor de IE para ambas estirpes foi referente à temperatura de 28°C, seguido da temperatura de 37°C (**Tabela 6**). Não foi detectada atividade nas temperaturas de 10°C e 56°C para nenhuma das estirpes.

A partir desse resultado, a estabilidade à acidez ou alcalinidade do meio foi analisada nas temperaturas de 28°C e 37°C, sendo testada uma faixa de pH de 5,0 a 11,0. As condições-padrão do ensaio de triagem da atividade agarolítica foram em uma temperatura de incubação de 25°C (subtópico 4.2), ressaltando que o meio de Hu possui um pH de $7,8 \pm 0,2$. Após a incubação das culturas por 7 dias, verificou-se que, na temperatura de 28°C, o maior valor de IE foi no pH 5,0, tanto para *Bacillus* sp. PA2MD8 quanto para *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11, com os IEs de 4,4 e 5,5, respectivamente (**Tabela 7**). Em relação a temperatura de 37°C, o resultado foi diferente. Não foi possível detectar atividade enzimática para a estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 em nenhum dos valores de pH testados nessa temperatura (37°C). Em relação à estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11, a 37°C e pH 10,0, o IE foi de 4,2, o maior para as condições testadas (**Tabela 8**).

Tabela 6: Valores médios de IE das estirpes agarolíticas *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 sob diferentes temperaturas de crescimento em meio de Hu (pH 7,8 ± 0,2).

Temperatura (°C)	<i>Bacillus</i> sp. PA2MD8	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11
	IE	IE
18	1,9	2,7
25	2,1	2,1
28	3,7	3,9
37	2,6	3,3
45	0	2

0: sem atividade agarolítica.

Tabela 7: Valores médios de IE das estirpes agarolíticas *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 frente a diferentes faixas de pH, a 28°C em meio de Hu (pH ajustado).

pH	<i>Bacillus</i> sp. PA2MD8	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11
	IE	IE
5	4,4	5,5
6	2,9	4,5
7	3,5	3,7
8	2,6	3,2
9	3,7	4,3
10	2,8	4,1
11	0	0

0: sem atividade agarolítica.

Tabela 8: Valores médios de IE das estirpes agarolíticas *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 frente a diferentes faixas de pH, a 37°C em meio de Hu (pH ajustado).

pH	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11
	IE
5	2,9
6	2,8
7	3,0
8	3,2
9	2,7
10	4,2
11	0

0: sem atividade agarolítica.

5.5 Triagem da produção de β -glicosidase em meio sólido

Com finalidade de confirmação da geração das enzimas envolvidas na degradação completa da celulose, as potenciais bactérias produtoras de celulase total em Ágar CMC, *Vibrio* sp. PA3G1 e *Vibrio* sp. PL1G11, foram avaliadas qualitativamente quanto à produção de β -glicosidases. A formação de complexos de esculetina e íons férricos foram

visualizados macroscopicamente apenas ao redor das colônias de *Vibrio* sp. PL1G11 (**Figura 8**), indicando uma possível atividade dessa celulase nessa estirpe e, por conseguinte, a atividade de todas as principais enzimas da via celulolítica (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas).

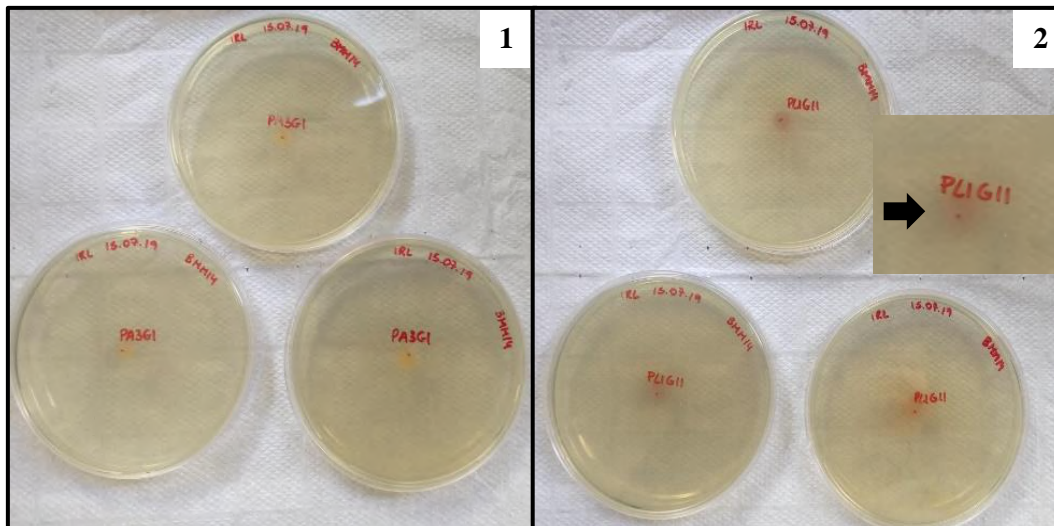


Figura 8: Placas dos resultados do teste de produção de β -glicosidase pelas bactérias celulolíticas *Vibrio* sp. PA3G1 (1) e *Vibrio* sp. PL1G11 (2). A seta indica a presença do complexo molecular ao redor da colônia da estirpe *Vibrio* sp. PL1G11.

5.6 Produção do extrato bruto enzimático de agarase e celulase

Foi possível observar a manutenção da atividade no extrato bruto enzimático nas quatro estirpes consideradas melhores produtoras nos três tempos de incubação testados (48, 72 e 144 horas), conforme esperado. Não houve diferenças visíveis no ensaio qualitativo realizado em nenhum dos tempos de incubação (**Figura 9**), indicando que as enzimas agarase e celulase estavam presentes no meio líquido tanto em 48, quanto 72 e 144 horas de incubação, não sendo possível concluir qual o tempo ideal para melhor produção enzimática por meio deste experimento.

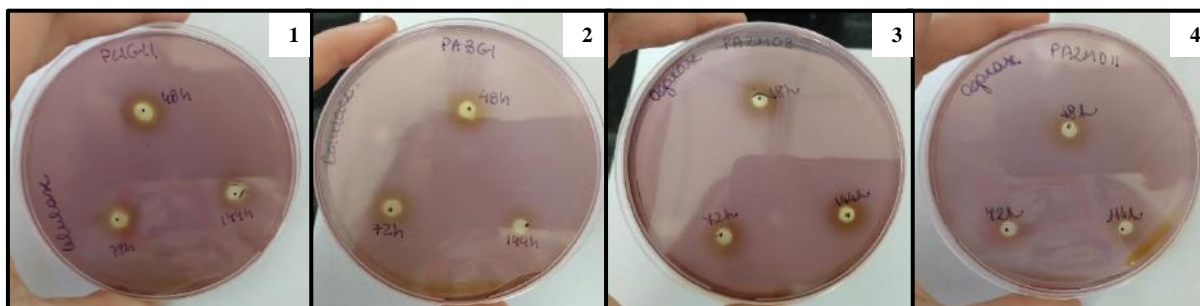


Figura 9: Placas referentes à verificação da manutenção da atividade enzimática do extrato bruto de agarase e celulase em relação ao tempo de incubação, sendo os números referentes às estirpes: *Vibrio* sp. PL1G11 (1), *Vibrio* sp. PA3G1 (2), *Bacillus* sp. PA2MD8 (3) e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 (4).

5.7 Quantificação da atividade de agarase e celulase do extrato bruto enzimático

As estirpes pré-selecionadas na etapa de triagem, foram avaliadas para verificar a atividade enzimática em meio líquido. (**Tabela 9**).

Tabela 9: Resumo das principais informações das estirpes bacterianas isoladas de *P. cyanorosea* consideradas potenciais produtoras enzimáticas de agarase e celulase.

Identificação da estirpe	Enzima produzida	Índice enzimático	Atividade em meio líquido
<i>Bacillus</i> sp. PA2MD8	Agarase	3,7	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PA2MD11	Agarase	3,9	0,345 U/mL*
<i>Vibrio</i> sp. PA3G1	Celulase	7,1	-
<i>Vibrio</i> sp. PL1G11	Celulase	8,3	-

*72 h de crescimento em meio líquido (meio de produção mínimo otimizado)

Para analisar a produção de celulases, as estirpes *Vibrio* sp. PL1G11 e *Vibrio* sp. PA3G1 foram cultivadas em meio contendo CMC como substrato e a verificação da atividade CMCase foi realizada com o extrato enzimático bruto obtido após 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de incubação através da dosagem da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico. Entretanto, não foi observada atividade enzimática em nenhum dos ensaios realizados.

Para avaliar a atividade de agarases, foram utilizadas as estirpes *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11, em que foi realizada a verificação da atividade agarolítica com o extrato enzimático bruto obtido após 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de incubação, seguido da dosagem da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico. Dentre as duas estirpes avaliadas, foi observada uma atividade de 0,345 U/mL apenas para estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 após 72 h de crescimento em meio líquido (meio de produção mínimo otimizado: 27% de extrato de levedura, 0,23% de ágar e água do mar artificial q.s.p. 1L) (**Figura 10**).

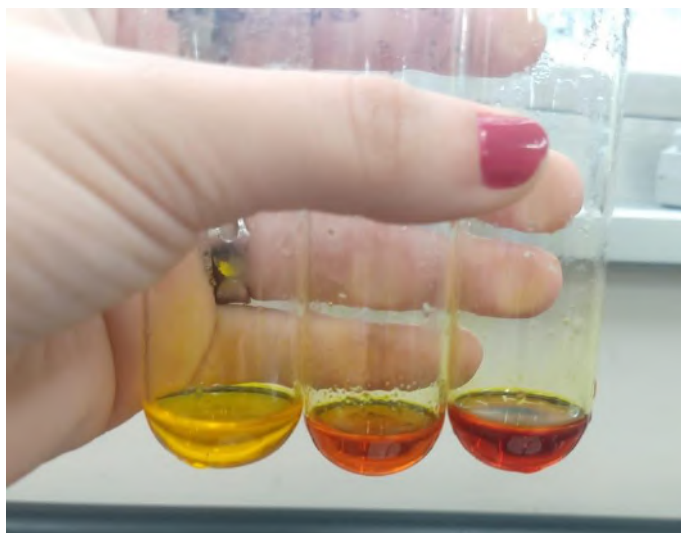


Figura 10: Tubos representativos da atividade positiva de agarase da estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 após 72 h de crescimento em meio líquido pela dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS, sendo amarelo: sem atividade, laranja: atividade positiva.

6 DISCUSSÃO

Os microrganismos marinhos são uma fonte emergente e propícia para a descoberta de enzimas (Ferrer *et al.*, 2019), particularmente por conta das suas propriedades, que as tornam úteis para aplicação em vários ambientes industriais (Trincon, 2017). Até o momento, as enzimas do microbioma de esponjas não receberam a mesma atenção que a prospecção de metabólitos bioativos de interesse farmacológico nesse holobionte (Oliveira *et al.*, 2020b). Deste modo, o presente projeto buscou analisar enzimas hidrolíticas produzidas por bactérias isoladas da esponja marinha *P. cyanorosea*, uma espécie recém-caracterizada no litoral brasileiro (Muricy *et al.*, 2019). Essa esponja pertence a mais nova classe reconhecida do filo Porifera, Homoscleromorpha, cujas descrições acerca do potencial biotecnológico da comunidade microbiana associada foram, no geral, infimamente exploradas.

A primeira etapa deste projeto se baseou na ampla avaliação da produção de hidrolases por um conjunto de estirpes bacterianas isoladas de cinco espécimes de *P. cyanorosea*, coletados na região da “Poça de Maré do Carolina”, na costa de Cabo Frio, RJ, Brasil. Foi verificada a produção de agarases, amilases, celulases, esterases, lipases e peptidases através de ensaios em placa com o meio contendo o substrato para cada hidrolase avaliada. A etapa de padronização dos meios de triagem para cada enzima hidrolítica estudada foi extremamente laboriosa, pois a composição de cada um dos meios deveria atender as condições fisiológicas básicas para o crescimento das bactérias nos mesmos. Por serem bactérias do ambiente marinho, foi necessário mimetizar as condições de salinidade e disponibilidade de nutrientes, além de favorecer a utilização do substrato para a produção e secreção da enzima no meio de cultura. Para tal, foi feita uma extensa revisão de literatura em busca de meios mais adequados para a triagem de cada enzima investigada e, após alguns testes com diferentes meios sólidos, consolidou-se os seis meios de triagem utilizados neste estudo (Tabela 2, Anexo I). Um exemplo de adaptação feita nos meios de cultura foi prepará-los com 50% (v/v) de água do mar artificial (ASW, do inglês, “*artificial seawater*”), em particular, para as bactérias isoladas nos meios Marine, Marine 1:10 e Gauze I, as quais em sua maioria não cresciam em meios nutrientes basais em uma composição de sais inferior a 1,0%, e constituíram a maior parte das bactérias recuperadas dos espécimes de *P. cyanorosea*.

Em decorrência do alto número de bactérias pré-selecionadas para triagem de seis diferentes enzimas hidrolíticas, somado à perda de viabilidade das bactérias isoladas do ambiente marinho em condições laboratoriais, houve variação no número de estirpes

testadas para cada uma das hidrolases. Levando em consideração que o conjunto de bactérias pré-selecionadas para triagem das enzimas amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase ser composto por mais de 200 estirpes, não foi possível testar simultaneamente todas as bactérias selecionadas para todas as enzimas. Essa etapa de triagem enzimática foi executada ao longo de 12 meses. Dessa forma, as bactérias isoladas que cresciam no meio de triagem para verificação da atividade enzimática eram selecionadas e, com as que apresentavam atividade positiva, as triplicatas dos testes eram realizadas. Era inviável já testar em triplicata para todas as estirpes e enzimas em uma única rodada experimental, tanto pelo fator-tempo quanto dos recursos necessários para realização de todas as etapas de rastreio enzimático em paralelo. Uma alternativa para conseguir testar um grande número de bactérias simultaneamente seria fazer um ensaio em placas de microdiluição, conforme recentemente delineado por Neves Junior e colaboradores (2020). No estudo, um método simples e sensível para detecção de amilases, poligalacturonases e endoglucanases foi desenvolvido. O método foi realizado em placas de 24 poços com o respectivo substrato para cada enzima incorporado com adição dos extratos enzimáticos brutos das enzimas e, após a incubação, formaram-se os halos de degradação. O ensaio proposto parece ser mais eficiente, rápido e requer menos reagentes e enzimas quando comparado com o método tradicional em placa de petri (150 x 15 mm). Além de poder ser usado quando muitas amostras precisam ser analisadas em um curto período de tempo, como em estudos de bioprospecção e rastreio da produção de hidrolases microbianas marinhas.

Um total de 207 estirpes foram positivas para dois ou mais dos cinco grupos enzimáticos analisados (amilase, celulase, esterase, lipase e peptidase) e 89,5% das estirpes pré-selecionadas e testadas para agarase possuíam atividade agarolítica em meio sólido. Apesar de preliminar, esses resultados já chamaram a atenção para o potencial de produção de hidrolases associado a microbiota de esponjas da classe Homoscleromorpha.

Embora tenha sido laborioso, os ensaios de verificação da atividade enzimática em meio sólido foram eficientes para triagem dos biocatalisadores-alvo, estando de acordo com o que é encontrado na literatura. Por exemplo, no estudo realizado por Maharsiwi e colaboradores (2020), cerca de 100 bactérias foram isoladas de cinco espécies de esponjas marinhas *Crella* sp., *Agelas* sp., *Callyspongia* sp., *Hyrtios* sp. e *Spongia* sp. (Demospongiae). Uma estirpe identificada como *Pseudomonas luteola* AGN89 produziu celulase e lacase e 11 estirpes pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Microbacterium* produziram celulase. As atividades enzimáticas foram

indicadas pelas zonas claras no meio CMC para celulase e a zona marrom-avermelhada no meio Guaiacol para lacase. Em outro estudo, realizado por Hinojosa, Asenjo e Leiva (2018), foi conduzida uma etapa de triagem para selecionar bactérias agarolíticas isoladas de macroalgas. No trabalho supracitado, foi avaliada a zona de hidrólise produzida por 21 estirpes diferentes em meio de cultura mínimo preparado com sal marinho e 1,8% de ágar. O estudo resultou na purificação de uma agarase produzida por uma estirpe de *Olleya* sp. com boa atividade em baixas temperaturas (4°C). A metodologia de triagem utilizada no presente trabalho se assemelhou aos dois trabalhos supracitados, visto que os três utilizaram as estirpes selvagens isoladas do ambiente marinho para realização da etapa de triagem em placa contendo o meio de cultura e o substrato específico para a enzima estudada, seguido da avaliação da zona de hidrólise formada. A partir dessa ampla triagem, os grupos enzimáticos agarase e celulase foram selecionados para as etapas subsequentes do trabalho.

Existem menos de dez trabalhos na literatura sobre enzimas celulolíticas isoladas de esponjas marinhas. No trabalho de El-Bondkly e El-Gendy (2012), vários fungos foram isolados da esponja marinha *Negombata corticata* e exibiram alta atividade de celulase a partir de diferentes substratos lignocelulósicos em fermentações de estado sólido (SSF). A estirpe recombinante Tahrir-25 isolada de *Trichoderma* sp. Merv6 produziu celulasas (exo- β -1,4-glucanase, endo- β -1,4-glucanase e β -1,4-glucosidase) em elevada quantidade, o que facilitou a celulólise completa de resíduos agrícolas, tais como bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e sabugo de milho. A maior recuperação de celulase das misturas de fermentação dessa biomassa vegetal foi alcançada com Tween 80 a 0,2% como agente de lixiviação. Em outro trabalho, a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis também foi estudada a partir das frações de casca e medula do bagaço da cana-de-açúcar, com e sem pré-tratamento alcalino por estirpes fúngicas, destacando-se a hidrólise por celulasas de *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, isolado da esponja *Chelonaplysilla erecta* (Demospongiae), com taxas de sacarificação de 56% e 81% a partir bagaço da cana-de-açúcar, respectivamente (Santos *et al.*, 2017). Com base nos estudos citados anteriormente, destaca-se o potencial de aplicação de celulasas produzidas por microrganismos isolados de esponjas marinhas em processos de produção de biocombustível de segunda e terceira geração.

A coleção bacteriana testada neste estudo se destacou quanto à produção de celulasas, pois 180 das estirpes tiveram $IE \geq 2,0$, representando 87,8% das bactérias

testadas com triplicata fechada com atividade celulásica. As estirpes do gênero *Vibrio* PA3G1 e PL1G11 apresentaram os maiores IEs em meio sólido de atividade enzimática de celulase, sendo 7,1 e 8,3, respectivamente. Bactérias do gênero *Vibrio* são gram-negativas heterotróficas obrigatórias que habitam ambientes marinhos e estuarinos como populações de vida livre ou em associação com organismos aquáticos (Thompson *et al.*, 2004). Algumas espécies deste gênero são patogênicas para animais marinhos e pessoas, enquanto a maioria não causa doenças e são membros das comunidades microbianas marinhas (Thompson e Polz, 2006). Espécies de *Vibrio* e outras bactérias marinhas heterotróficas desempenham um papel significativo no ciclo oceânico de carbono, degradando ativamente a matéria orgânica complexa por meio de uma sequência definida de reações catabólicas especializadas (Zhang *et al.*, 2018).

As estirpes que são potenciais produtoras de celulase, *Vibrio* sp. PA3G1 e *Vibrio* sp. PL1G11, foram avaliadas qualitativamente quanto à produção de β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Os complexos moleculares com pigmentação escura foram visualizados apenas ao redor das colônias da estirpe *Vibrio* sp. PL1G11. Esse resultado pode indicar que apenas essa estirpe que apresentou um resultado positivo nesse teste qualitativo produz GHs β -glicolíticas que atuam nas etapas finais da degradação completa da celulose. O meio de triagem e outras condições de incubação utilizadas para a detecção de atividade β -glicolítica podem também ter interferido na produção dessa enzima em meio sólido para a estirpe *Vibrio* sp. PA3G1, tendo em vista que os halos visualizados ao redor das colônias da estirpe *Vibrio* sp. PL1G11 serem tênues e de difícil visualização, quando comparado ao que é observado em outros trabalhos. Uma alternativa seria utilizar uma maior concentração de esculina para garantir uma melhor visualização dos halos ao redor das colônias das estirpes β -glicolíticas. A atividade β -glicolítica já foi detectada em bactérias do gênero *Vibrio* anteriormente. No trabalho de Wang e colaboradores (2015), uma nova β -glucosidase (LamN) de *Vibrio campbellii* isolado de camarão foi caracterizada como uma exolaminarinase estável ao calor capaz de utilizar a laminarina, uma poliglucana armazenada por como substrato. Além de atividade de β -1,3, β -1,4 e β -1,6 glicosidase, essa β -glucosidase também tinha sua produção induzida por laminarina. Apesar de terem sido realizadas uma abordagem e metodologia diferentes do que foi conduzido no presente estudo, a busca por β -glicosidases em vibrios se faz relevante, pois contribuem para uma compreensão melhor do papel que essas bactérias podem desempenhar no ciclo do carbono nos ecossistemas marinhos, além da possibilidade da

descoberta de novas enzimas com características relevantes no campo industrial e biotecnológico.

Consecutivamente aos experimentos citados anteriormente, foi verificado que a atividade enzimática das duas estirpes de agarase e das duas de celulase se manteve no sobrenadante após a centrifugação nos três tempos de incubação (48, 72 e 144 horas). Essa confirmação da manutenção da atividade enzimática presente no extrato bruto enzimático após a etapa de centrifugação foi vista em trabalhos prévios, como no estudo de Malik e Furtado (2019b). Neste estudo, a atividade celulásica de uma haloarqueea *Haloferax sulfurifontis* GUMFAZ2 isolada de um espécime da esponja marinha *Haliclona* sp. foi investigada. A manutenção da atividade do sobrenadante livre de células foi detectada. Assim como no atual trabalho, os autores também testaram a presença da atividade no extrato bruto enzimático em meio sólido, em que o sobrenadante da cultura livre de células foi adicionado em poços individuais perfurados no meio de cultura contendo 20% meio sintético com NaCl acrescido de 0,5% de ágar carboximetilcelulose - Na. A produção de celulase foi demonstrada pela coloração do ágar com vermelho do Congo a 0,1% (m/v) por 30 min e então descoloração por 10 min com NaCl 1 N, sendo possível observar uma zona de hidrólise em torno da atividade de celulase. Ambos os estudos utilizaram enzimas provenientes do microbioma de esponjas e obtiveram um resultado positivo para atividade enzimática no sobrenadante, ressaltando a relevância da realização dessa metodologia em estudos de produção de extrato bruto enzimático.

Apesar do substrato utilizado para a produção de celulase em meio líquido ter sido o mesmo empregado na triagem em meio sólido, e que neste último os IEs observados tenham sido os maiores, não foi observada atividade celulásica através da dosagem da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico após 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de incubação para nenhuma das estirpes. Fatores como fontes de carbono e nitrogênio, concentração de substrato, entre outros, podem induzir e influenciar a produção e a concentração de celulases (Islam e Roy, 2019). Nesse sentido, seria necessário estudar diferentes meios de fermentação, levando em consideração variações na concentração de nutrientes e condições de incubação, além de testar outras estirpes que também apresentaram bons IEs, para enzimas do complexo celulolítico. Outras possíveis explicações para a ausência da atividade celulolítica em meio líquido por essas estirpes de *Vibrio* isoladas de *P. cyanorosea* seria o tempo de meia-vida curto e instabilidade dessas celulases, seguidamente a sua liberação pelas células bacterianas ou sua

localização celular associada a membrana externa ou ainda no espaço periplasmático, como sugerido em análises preliminares do genoma dessa estirpe.

Várias enzimas hidrolíticas extracelulares degradadoras de polissacarídeos, celulose, quitina e ágar como fonte de carbono e energia já foram identificadas em espécies bacterianas do gênero *Vibrio* (Hunt *et al.*, 2008). Como por exemplo, a estirpe *Vibrio* sp. LX-3 isolada de solo que foi capaz de digerir celulose cristalina e ágar, em que a carboximetilcelulase (CMCase) foi produzida extracelularmente quando várias celuloses foram usadas como fontes de carbono. A CMCase foi estável na faixa de pH 5,0–10,0, com temperatura ótima de 40 °C e mostrou atividades diferentes em vários sistemas tampão, sendo a maior atividade observada no tampão de acetato, mas não significativamente diferente dos outros tampões (Li *et al.*, 2003). Embora as celulases tenham sido isoladas de vários gêneros bacterianos, nenhum gene funcional de celulase tinha sido relatado no gênero *Vibrio* até o trabalho de Gao e colaboradores (2010). Um novo gene codificador de endo- β -1,4-glucanase, *cel5A*, foi clonado a partir de *Vibrio* sp. G21 isolado de amostra de solo de mangue. A enzima Cel5A foi expressa em *Escherichia coli*, a seguir foi purificada (coluna Bio-Gel P-60) por meio de cromatografia de filtração em gel e caracterizada bioquimicamente. O pH e a temperatura ideais da atividade da enzima recombinante foram 6,5-7,5 e 50°C, respectivamente. Cel5A foi estável em uma ampla faixa de pH e sua atividade aumentou 1,6 vezes em NaCl 0,5 M e permaneceu elevada mesmo em em uma concentração de 4 M. A atividade residual da enzima correspondente à mais de 90% da atividade total, mesmo após o tratamento em pH 5,5–10,5 por 1 h, indicando alta resistência aos álcalis, sendo uma candidata para pesquisas futuras e aplicações industriais. Sendo assim, celulases produzidas por bactérias do gênero *Vibrio* despertam o interesse, por conta das características relatadas nos trabalhos até o momento, como a β -glicosidase estável ao calor atuando em diferentes ligações do tipo β , celulases estáveis a uma ampla faixa de pH e até resistência à álcalis e sal (Li *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2010; Malik e Furtado, 2019b). Dessa forma, faz-se válido o continuado estudo de celulases em bactérias desse gênero sob a ótica biotecnológica.

As estirpes com os maiores IEs em meio sólido de atividade enzimática de agarase foram classificadas taxonomicamente nos gêneros *Bacillus* (PA2MD8) e *Pseudoalteromonas* (PA2MD11). Existem poucos relatos na literatura de agarases produzidas por espécies do gênero *Bacillus*, especialmente as isoladas do ambiente marinho. No entanto, as enzimas agarolíticas produzidas por essas bactérias apresentam algumas vantagens adaptativas e produtos de hidrólise com atividades biológicas

associadas. Kim e colaboradores (1999) purificaram uma β -agarase extracelular de uma estirpe marinha de *Bacillus cereus*. O pH e temperatura ótimos da atividade da agarase ASK202 foram 7,0 e 40 °C, respectivamente. Também foi visto que a enzima catalisou a hidrólise da ligação glicosídica β -1,4 da agarose para produzir neoagarohexaose, neoagarotetraose e neoagarobiose. Uma outra endo- β -agarase foi purificada de *Bacillus* sp. MK03 isolado do solo que teve como produto de hidrólise predominante a neoagarotetraose. O pH e temperatura ótimos para essa enzima foram 7,6 e 40°C, respectivamente (Suzuki *et al.*, 2003). A neoagarotetraose (NA4) tem atividade biológica já relatada em experimentos com camundongos, podendo ser um potencial prebiótico na modulação da microbiota intestinal e, assim, promove a saúde do hospedeiro. Além disso, NA4 pode ter efeitos antifadiga em camundongos sob intenso estresse por exercício, na qual a lesão hepática induzida por exercício intenso pode ser aliviada por NA4 e pode estar relacionada ao seu efeito prebiótico (Zhang *et al.*, 2017a, b; Chen *et al.*, 2019).

O maior valor de IE (4,4) para a estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 foi obtido no pH de 5,0 e temperatura de 28°C no ensaio em placa. Essa temperatura ótima se aproximou da encontrada para a estirpe *Bacillus* sp. SYR4, isolada de um banco de areia, potente para o reaproveitamento de resíduos de algas vermelhas. A bactéria apresentou atividade de agarase e carrageenase, sendo o pH 7,5 e a temperatura de 30°C ideais para a degradação do ágar e da carragenana. O reaproveitamento ecologicamente correto de resíduos de algas vermelhas por essa estirpe para a produção de açúcares redutores se apresentou viável (Kang e Kim, 2015).

Notavelmente, a agarase deste estudo apresentou atividade em meio de cultura sólido em uma ampla faixa de pH, de 5,0 – 10,0 a 28°C. Em outro estudo, uma agarase extracelular foi purificada a partir de *Bacillus* sp. BI-3, uma bactéria termofílica isolada de fonte termal na Indonésia. A atividade da agarase foi estável em altas temperaturas, sendo 70°C a temperatura ótima, e a atividade residual foi mais de 50% a 80°C por 15 min. O pH ótimo da atividade da agarase foi 6,4, em que a atividade residual foi mais de 60% (Li *et al.*, 2014). Essa agarase isolada do ambiente marinho apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH (5,8-8,0), bem como potencial enzima agarolítica de *Bacillus* sp. PA2MD8 do presente estudo, que apresentou atividade em uma faixa ainda maior, ressaltando a capacidade das agarases de *Bacillus* serem capazes de manter a atividade em pHs ácidos, neutros e básicos (Yun, Yu e Kim, 2017).

A termoestabilidade em meio sólido também foi uma característica que chamou atenção, pois a estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 manteve sua atividade na faixa de

temperatura de 18 a 37°C. Não foi possível detectar atividade enzimática para a estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 em nenhum dos valores de pH testados na temperatura de 37°C, sendo este um resultado contraditório aos experimentos de termoestabilidade, visto que essa estirpe apresentou atividade quando incubada na mesma temperatura. Uma sugestão sobre um possível erro que pode ter acontecido é em relação à estirpe bacteriana. Provavelmente a estirpe não estava viável no momento da realização do ensaio. Portanto, tal experimento deverá ser repetido posteriormente para a avaliação de atividade nessa faixa de temperatura e o real impacto de distintas faixas de pH sob a mesma para *Bacillus* sp. PA2MD8.

Uma informação adicional sobre a agarase da estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 é o fato da mesma aparentemente não possuir uma agarase considerada verdadeira, ou seja, pertencente à família das glicosídeo-hidrolases (Oliveira *et al.*, 2020a). Tal fato sugere que alguma outra enzima ativa no metabolismo de carboidratos (CAZyme, do inglês, “*carbohydrate-active enzyme*”) possa estar envolvida com a atividade agarolítica encontrada, visto que uma CAZyme pode ter múltiplas atividades. Isso é bem ilustrado pelo trabalho de Li, Gu e Pan (2019), em que uma α -amilase de *Bacillus* BI-19 isolado de fonte termal apresentou múltiplas atividades de agarase, carragenase e celulase. Após a expressão heteróloga do gene codificador da α -amilase, a Amy19 recombinante foi capaz de degradar amido solúvel, agarose, carragenana e celulose. Para explorar o mecanismo multifuncional de Amy19, três motivos da família de GH 70 na sequência codificadora da enzima foram deletados um a um, depois aos pares, depois todos de uma vez e foi verificado que a multifuncionalidade não foi determinada apenas pelos motivos GH 70. Sendo assim, o potencial da produção de agarases por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* não se torna inválido por conta dessa possível ausência de agarases verdadeiras da estirpe *Bacillus* sp. PA2MD8 aqui relatada. Outras polissacaridases com amplas especificidades de substrato e que não sejam GHs agarolíticas verdadeiras podem estar envolvidas na degradação desse polissacarídeo marinho nessa estirpe, como em *Bacillus* BI-19 produtor de Amy-19 (Li, Gu e Pan, 2019).

As agarases são enzimas ainda de custosa produção que possuem diversas aplicações em diversos setores industriais (Yun, Yu e Kim, 2017; Jahromi e Barzkar, 2018; Park *et al.*, 2020). Muitos estudos foram realizados com esse grupo enzimático, porém dentre as agarases marinhas, até o momento só tiveram apenas dois relatos na literatura de exoagarases detectadas em meio sólido de estirpes microbianas isoladas de esponjas (Imhoff e Stöhr 2003, Li *et al.*, 2007). Não existe nenhum estudo com a

determinação da atividade enzimática, isolamento, purificação e caracterização bioquímica de agarases a partir do microbioma de esponjas. A ínfima exploração dessas polissacaridasas a partir desses invertebrados é relativamente contraintuitiva, uma vez que a maioria das agarases foram isoladas de água do mar, sedimento marinho, intestino de peixes e algas marinhas (Fu e Kim, 2010). Já foram relatadas na literatura, agarases atuantes nas mais diversas faixas de temperatura e pH, conforme compilado por Park e colaboradores em sua ampla revisão de 2020. Todavia, a maioria das agarases são investigadas na sua forma recombinante, diferindo das agarases que foram testadas no presente trabalho, pela produção diretamente da estirpe selvagem.

O maior valor de IE (5,5) para a estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 foi obtido no pH de 5,0 e temperatura de 28°C visualizada no ensaio em meio sólido. *Gayadomonas joobiniege* G7 é uma bactéria degradadora de ágar, que produz várias agarases que foram caracterizadas bioquimicamente (Jung *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2019). Algumas delas apresentavam características que correspondem às encontradas na avaliação da termoestabilidade e faixa de pH ótimo no presente estudo. AgaJ9, a agarase recombinante isolada de *G. joobiniege* G7, apresentou um pH e temperatura ótimos para a atividade agarolítica de 5,0 e 25°C, respectivamente. Notavelmente, AgaJ9 é uma β -agarase adaptada ao frio cuja atividade residual corresponde à mais de 80% de sua atividade total, mesmo a uma temperatura de 5°C (Jung *et al.*, 2017). AgaJ10, outra agarase recombinante também isolada de *G. joobiniege* G7, apresentou pH e temperatura ótimos de 5,0 e 30°C, respectivamente. AgaJ10 exibiu uma tolerância ao frio, retendo mais de 40% de sua atividade enzimática a 5°C (Choi *et al.*, 2019). Várias β -agarases exibindo psicrotolerância foram bioquimicamente caracterizadas e β -agarases acidófilas interessantes já foram identificadas. Para processos industriais como a produção de biocombustíveis, que requerem hidrólise total do ágar, o uso de β -agarases acidófilas juntamente com o tratamento com solventes ácidos em condições moderadas é altamente desejável (Park *et al.*, 2020).

Para confirmar que a agarase da *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 compartilha essas características bioquímicas adaptativas, seria necessário a purificação e caracterização bioquímica da mesma. A estirpe de *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 apresentou atividade agarolítica em placa em uma ampla faixa de pH, de 5,0 – 10,0 a 28°C e esse comportamento também se repetiu na temperatura de 37°C. Essa estirpe ainda apresentou atividade agarolítica na faixa de 18 a 45°C em meio sólido, destacando uma

potencial termoestabilidade ampla da enzima. No trabalho de Li e Sha (2015), uma *Pseudoalteromonas* sp. NJ21 degradadora de ágar foi isolada de uma amostra de sedimento da Antártica. A enzima recombinante rAga1161 exibiu atividade em uma ampla faixa de pH, com atividade enzimática máxima em pH 8,0 e atividade residual de mais de 70% em uma faixa de pH de 6,5–9,0. A rAga1161 exibiu atividade em temperaturas variando entre 10 e 40°C, com seu pico de atividade relatado a 40°C. Além disso, rAga1161 foi estável entre 10 e 30°C por 180 min, e apresentou pelo menos 70% de atividade residual a 40°C por 30 min. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 50°C por 30 min, a atividade relativa da enzima diminuiu para 20%-30%. O padrão de hidrólise do ágar demonstrou que a enzima é uma β -agarase, produzindo neoagarobiose (NA2) como produto final principal e os resultados indicaram o potencial da agarase como catalisador nas indústrias de medicamentos, alimentos e cosméticos (Li e Sha, 2014). Dessa forma, é possível fazer uma associação da estabilidade ao pH e a temperatura com a agarase do presente trabalho, visto que foram valores parecidos com os relatados para a agarase dessa estirpe psicrófila, destacando as possíveis aplicações industriais. Vale ressaltar que no trabalho de Li e Sha (2014) foi utilizada uma enzima agarolítica recombinante, ao passo que as agarases investigadas neste trabalho foram acessadas diretamente a partir da estirpe selvagem de *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 isolada de esponja marinha.

Pseudoalteromonas é um gênero bacteriano marinho amplamente explorado quanto à produção de agarases (Park *et al.*, 2020). Há registros de patentes de agarases e seus métodos de obtenção de bactérias desse gênero, como a agarase extracelular produzida pela estirpe *Pseudoalteromonas* JYBCL1 (South Korea patente nº KR101235265B1), usada em uma variedade de aplicações nas indústrias de biotecnologia, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Essa estirpe produz uma agarase com boa estabilidade iônica e apresenta excelente atividade enzimática. Além disso, essa agarase chama a atenção no ponto de vista da biorrefinaria, na degradação de biomassa para produção de bioenergia (Oh, Jung e Lee, 2011; Jung *et al.*, 2012). Outra patente é a CN105420142A, da China, que visa fornecer uma estirpe *Pseudoalteromonas* sp. QJ97 com vantagens de ter alta estabilidade, curto período de produção e baixo custo quando usada na produção de agarase, sendo adequada para produção na indústria. No entanto, não existe nenhum relato sobre a produção de agarases em *Pseudoalteromonas* isoladas de esponjas marinhas.

Foi verificado que a agarase produzida pela estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 manteve a atividade no sobrenadante livre de células. Um outro estudo com uma *Pseudoalteromonas antarctica* N-1 também realizou a separação do sobrenadante e posterior utilização para determinação da atividade de agarase (Vera *et al.*, 1998). Dessa forma, torna-se válido a realização da produção do extrato bruto enzimático a partir da centrifugação. Foi observada atividade de 0,345 U/mL em meio líquido apenas para estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11. Esse valor de atividade encontrado corrobora com outras agarases produzidas a partir de estirpes selvagens, como nos trabalhos de Lakshmikanth e colaboradores (2006), cujas atividades das estirpes *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 e *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11 foram 0,450 U/mL e 0,307 U/mL, respectivamente. Como foi a única das quatro estirpes testadas neste trabalho que apresentou atividade em meio líquido, resolveu-se seguir com as análises com a estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade da determinação da atividade da enzima purificada, seja da estirpe selvagem seja na forma recombinante, para saber se a atividade encontrada pode ser considerada baixa ou não quando comparada com os demais relatos presentes na literatura.

Tanto nos experimentos de produção de agarase em meio líquido quanto nos de triagem em meio sólido, o substrato utilizado foi o mesmo, o próprio ágar, com diferenças na concentração, sendo 0,2% e 1,5%, respectivamente. No trabalho de Hu e colaboradores (2009), foi visto um aumento diretamente proporcional da densidade bacteriana com a concentração do ágar suplementada no meio sob as condições de agitação a 175 rpm a 25°C por 16 h. Isso ocorre provavelmente porque a agarase foi induzida pelo ágar presente no meio de cultura e a bactéria agarolítica usou esse ágar como fonte de carbono para o crescimento. A investigação da produção da agarase utilizando a estirpe selvagem pode ser um fator que explique a baixa atividade e a dificuldade na padronização do cultivo em meio líquido, visto que a produção enzimática pode estar submetida a algum mecanismo de repressão catabólica.

A composição do meio de produção também pode ser um fator que está diretamente associado ao crescimento bacteriano e consequente liberação da enzima no meio líquido. O meio líquido utilizado para a produção de agarase pela estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 foi adaptado a partir do meio otimizado de Fu e colaboradores (2009). No estudo, a produção de agarase de *Agarivorans albus* YKW34 foi obtida no meio composto por 0,23% de ágar e 0,27% de extrato de levedura em pH inicial de 7,81, resultando no aumento na atividade de agarase de 0,23 U/mL para 0,87

U/mL. Portanto, a mesma composição foi utilizada no meio líquido do presente trabalho, com uma pequena alteração, em que o mesmo foi preparado com ASW, tendo em vista a necessidade da presença de sais no meio para crescimento da bactéria utilizada. Cada um dos componentes do meio de cultura pode ter um efeito indutor ou de repressão na expressão dos genes codificadores desse microrganismo, sendo necessário a realização de um conjunto de experimentos de otimização do meio, no qual podem ser realizadas algumas estratégias, por exemplo, alterando a concentração de um dos componentes do meio por vez, para verificação da concentração ideal de cada um dos reagentes (Sarkar *et al.*, 2010).

Existem relatórios limitados sobre a atividade de agarase em meio de fermentação. No trabalho de Park, Hong e Chang (2014), a atividade da agarase foi diretamente afetada pela composição do meio. A β -agarase (DagA) foi produzida pelo cultivo de uma estirpe de *Streptomyces lividans* recombinante em meio contendo glicose ou açúcar misto simulando hidrolisado de microalgas. O meio contendo glicose possuía uma composição com 25 g/L de glicose, sendo obtida uma atividade de 7,26 U/mL. Quando um meio misto de açúcar contendo 25 g/L de açúcares (glicose, galactose, xilose, ramnose, ribose e manose) foi usado, a atividade foi de 4,81 U/mL, com uma eficiência de utilização de substrato muito baixa devido à repressão catabólica da glicose contra os outros açúcares, tendo em vista que em muitos microrganismos a glicose é rapidamente utilizada e reprime a produção de enzimas relacionadas ao consumo de outros substratos de carbono. Em seguida, visando a eliminação dos efeitos negativos, a glicose foi removida do meio, resultando em um aumento inesperado da atividade de DagA, de cerca de 8,7 U/mL, apesar de uma quantidade menor de açúcares (xilose, ramnose, ribose e manose) ter sido usada na composição do meio. Com base nessas observações, concluiu-se que a glicose teve um efeito negativo na produção da enzima. Outro estudo com uma bactéria agarolítica, relatou que a síntese da enzima foi reprimida quando a glicose foi adicionada ao meio de cultura, em que a enzima parecia estar sujeita à repressão catabólica. A produção enzimática foi ótima quando *Cytophaga flevensis* foi crescida a 20°C em um meio mineral com ágar como única fonte de carbono (van der Meulen e Harder; 1975). Poucos dados estão disponíveis a respeito da regulação da expressão de genes de agarases em bactérias, principalmente orientados sob uma perspectiva de produção industrial.

Bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* têm sido recuperadas de esponjas, nas quais duas das espécies pertencentes ao gênero foram originalmente isoladas de esponjas

marinhas das espécies *Fascaplysinopsis reticulata* e *Mycale adhaerens* (Ivanova *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2005). No geral, *Pseudoalteromonas* associadas a esponjas são mais exploradas como fontes de substâncias antimicrobianas (Indraningrat, Smidt e Sipkema, 2016), havendo pouco conhecimento acerca das características adaptativas simbióticas neste hospedeiro invertebrado (Oliveira *et al.*, in prep).

Uma característica interessante de *Pseudoalteromonas* é que o gênero pode ser dividido em clados de espécies pigmentadas e não pigmentadas (Egan *et al.*, 2002). Espécies não pigmentadas de *Pseudoalteromonas* tendem a possuir uma multiplicidade de atividades enzimáticas (carragenases, quitinases, alginases, enzimas ativas a frio), faixas de tolerância ambiental geralmente mais amplas (temperatura, atividade de água e pH) e versatilidade nutricional substancialmente maior em comparação com as espécies pigmentadas (Bowman e McMeekin, 2005). Mais recentemente, foi confirmado que as estirpes não pigmentadas de *Pseudoalteromonas* tem seus genomas enriquecidos em GHs que degradam polissacarídeos (Paulsen *et al.*, 2019). A estirpe *Pseudoalteromonas* PA2MD11 forma uma colônia não pigmentada, característica essa que corrobora com as informações da literatura.

Nas análises de anotação do genoma da estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 foram identificados cinco genes codificadores de agarase (Oliveira *et al.*, in prep). Assim, conforme é relatado na maioria dos trabalhos da literatura, futuramente será feita a clonagem e expressão heteróloga destes genes a fim de melhor caracterizar a atividade destas potenciais agarases marinhas. A tecnologia do DNA recombinante, utilizando métodos clássicos de clonagem e expressão heteróloga, é mais proveitosa do que trabalhar com a estirpe selvagem. Sabe-se que a expressão heteróloga de proteínas recombinantes, em muitos casos, facilita o isolamento e purificação em concentrações suficientes para análises de caracterização bioquímica. Tal etapa é crucial para a definição da existência de propriedades bioquímicas necessárias e vantajosas para o uso industrial desses biocatalisadores microbianos. Assim, as perspectivas futuras deste trabalho incluem melhorar a produção e seguir com a purificação e caracterização bioquímica da agarase da estirpe *Pseudoalteromonas* PA2MD11.

A partir das estirpes isoladas da esponja *P. cyanorosea* foi possível avaliar a produção de seis grupos de hidrolases onde quatro estirpes tiveram maior destaque. Dentre estas, a estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 mostrou atividade agarolítica em seu extrato bruto e as condições ideais de fermentação para a produção de agarase será investigada futuramente. Apesar de inicial, este estudo gerou resultados que podem

direcionar uma melhor caracterização do potencial biotecnológico de bactérias associadas à esponja *P. cyanorosea* do litoral da cidade de Cabo Frio, no Rio de Janeiro. Nesse contexto, o atual trabalho se destaca por ser o primeiro a fazer uma triagem ampla de exoenzimas hidrolíticas de estirpes isoladas de esponjas. Também contribui para salientar a necessidade de estudar as bactérias cultiváveis de esponjas marinhas, visando explorar o seu potencial enzimático.

7 CONCLUSÃO

- Bactérias isoladas da esponja marinha *P. cyanorosea* foram positivas para a produção de dois ou mais dos cinco grupos de hidrolases analisados;
- As estirpes que se destacaram como produtoras de agarase foram *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 e de celulase foram *Vibrio* sp. PA3G1 e PL1G11;
- A atividade de agarase das estirpes *Bacillus* sp. PA2MD8 e *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 foi observada em uma ampla faixa de pH (5,0 a 10,0) em meio sólido.
- A atividade agarolítica de *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 se mostrou termoestável em meio sólido;
- Apenas a estirpe *Vibrio* sp. PL1G11 apresentou resultado positivo no teste qualitativo da produção de β -glicosidase em meio sólido;
- O extrato bruto de agarase e celulase das potenciais estirpes bacterianas produtoras manteve a atividade enzimática após centrifugação;
- A estirpe *Pseudoalteromonas* sp. PA2MD11 se destacou por apresentar atividade agarolítica de 0,345 U/mL em meio líquido;
- Dados preliminares de condições ótimas de pH e temperatura para atividade das enzimas em meio líquido foram obtidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, K. L. e Douglas, A. E. (2017). Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Curr. Opin. Microbiol.* 35, 23–29.
- Adamska, M. (2016). Sponges as models to study emergence of complex animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 39, 21–28.
- Aehle, W. (2007). Chapter 1. *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Third Edition, pp. 1-12.
- Allied Market Research. (2019). *Research Market Report 2019*. Disponível em <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em 11/05/2020.
- Alves, P. D. D., Siqueira, F. de F., Facchin, S., Horta, C. C. R., Victória, J. M. N. e Kalapothakis, E. (2014). Survey of microbial enzymes in soil, water, and plant microenvironments. *Open. Microbiol. J.* 8(1), 25–31.
- Ambrosino, L., Tangherlini, M., Colantuono, C., Esposito, A., Sangiovanni, M., Miralto, M., Sansone, C. e Chiusano, M.L. (2019). Bioinformatics for marine products: an overview of resources, bottlenecks, and perspectives. *Mar. Drugs* 17(10), 576.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V. e Balasubramanian, T. (2014). Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass. Bioenerg.* 68, 151-160.
- Antranikian, G. e Klingenberg, M. Thermostable protease from *Staphylothermus*. Depositantes: Garabed Antranikian e Michael Klingenberg. França n. WO199101979A1. Depósito: 15 jun. 1990. Concessão: 26 dez. 1991. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO199101979A1/en#citedBy>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- Antranikian, G. e Klingenberg, M. Thermostable protease from *Staphylothermus*. Depositantes: Garabed Antranikian e Michael Klingenberg. Estados Unidos n. US5643777. Depósito: 09 mar. 1995. Concessão: 01 jul. 1997. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d8/c0/2a/d58eac54974c07/US5643777.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- Araújo, F. V., Netto, M. C. M., Azevedo, G. P., Jayme, M. M. A., Nunes-Carvalho, M. C., Silva, M. M. e Carmo, F. L. (2017). Ecology and biotechnological potential of bacterial community from three marine sponges of the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89(4):2785-2792.
- Arbige, M. V., Shetty, J. K. e Chotani, G. K. (2019). Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends in Biotechnol.* 37(12), 1355-1366.
- Arnosti, C., Bell, C., Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R. L., Steen, A. D., Stromberger, M., Wallenstein, M. e Weintraub, M. N. (2013). Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: perspectives on system variability and common research needs. *Biogeochemistry* 117(1), 5–21.
- Arundel, A. e Sawaya, D. (2010). *Biotechnologies in agriculture and related natural resources to 2015*. OECD Journal: General Papers.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. Washington, D.C.
- Badgular, S. e Mahajan, R. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *J. Pharm. Res.*
- Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A. e Delgado, A. N. (2020). The holobiont concept before Margulis. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 334(3):149-155.
- Bajaj, P. e Mahajan, R. (2019). Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *App. Microbiol. Biotechnol.* 103(21-22), 8711-8724.
- Barrett, A. J. e Rawlings, N. D. (2007). ‘Species’ of peptidases. *Biol. Chem.* 388, 1151-1157.
- Barthel, D., Gutt, J. e Tendal, O.S. (1991). New information on the biology of Antarctic deep water sponges derived from underwater photography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69, 303–307.
- Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, R. e Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles* 22(3), 335–346.
- Barzkar, N. e Sohail, M. (2020). An overview on marine cellulolytic enzymes and their potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(16), 6873-6892.

- Batista-García, R. A., Sutton T., Jackson S. A., Tovar-Herrera O. E., Balcázar-López E., del Rayo Sanchez-Carbente M., Sánchez-Reyes A., Dobson A. D. e Folch-Mallol J. L. (2017). Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. PLoS ONE. 12, e0173750.
- Bell, J. J. e Barnes, D.K.A. (2000). A sponge diversity centre within a marine island. *Hydrobiologia* 440, 55–64.
- Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuar. Coast. Shelf. S.* 79(3), 341–353.
- Bell, J. J., Davy, S. K., Jones, T., Taylor, M. W. e Webster, N. S. (2013). Could some coral reefs become sponge reefs as our climate changes? *Glob. Chang. Biol.* 19(9), 2613–2624.
- Bergquist, P. R. (1978). *Sponges*. Univ of California Press.
- Bibi, F., Alvi, S. A., Al-Sofyani, A., Yasir, M., Kensarah, E. A. e Azhar, E. I. (2018). Two marine sponges-associated cultivable bacteria: Diversity and biological activities. *Genet. Mol. Res.* 17(2), gmr16039910.
- Borchert, E., Selvin, J., Kiran, S. G., Jackson, S. A., O'Gara, F. e Dobson, A. D. W. (2017). A Novel cold active esterase from a deep sea sponge *Stelletta normani* metagenomic library. *Front. Mar. Sci.* 4, 287.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(1), 73–81.
- Borrelli, G. M. e Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.* 16(9), 20774–20840.
- Boury-Esnault, N., Muricy, G., Galissian, M.F., e Vacelet, J. (1995). Sponges without skeleton: a new Mediterranean genus of Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Ophelia* 43, 25–43.
- Boury-Esnault, N., Lavoie, D.V., Ruiz, C.A. e Pérez, T. (2013). The integrative taxonomic approach applied to Porifera: a case study of the Homoscleromorpha. *Integr. Comp. Biol.* 53, 416–427.
- Bowman, J. P. e McMeekin, T. A. (2005). Genus XI. *Pseudoalteromonas* Gauthier, Gauthier and Christen 1995a, 759VP.
- Brahmachari, G., Demain, A. L., Adrio, J. L. (2017). Useful microbial enzymes - an introduction. in: *biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and industrial applications*, First Edition. (Estados Unidos: Elsevier), pp. 1-37.
- Brusca, R.C., Moore, W. e Shuster, S. M. (2016). Phylum Porifera: The Sponges. In: *Invertebrates*, Third Edition. (Estados Unidos: Guanabara Koogan), pp. 216-259.
- Bull, A. T., Ward, A. C. e Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573–606.
- Carballo, J. L. e Bell, J. J. (2020). Climate change and sponges: an introduction. in: *climate change, ocean acidification and sponges: impacts across multiple levels of organization*. Springer Nature, 95(2), 1-11.
- Chapman, J., Ismail, A. e Dinu, C. (2018). Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8(6), 238.
- Chen, X., Yu, J., Xue, C., Wang, Y., Tang, Q. e Mao, X. (2019). Mechanism of neoagarotetraose protects against intense exercise-induced liver injury based on molecular ecological network analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83(7), 1227-1238.
- Chi, W., Chang, Y. e Hong, S. (2012). Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 917-30.
- Choi, U., Jung, S., Hong, S. K. e Lee, C. R. (2019). Characterization of a novel neoagarobiose-producing GH42 β -agarase, agaj10, from *Gayadomonas joobiniege* G7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 189, 1–12.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4), 840–862.
- Cleary, D. F. R., Swierts, T., Coelho, F. J. R. C., Polónia, A. R. M., Huang, Y. M., Ferreira, M. R. S., Putschakarn, S., Carvalheiro, L., van der Ent, E., Ueng, J., Gomes, N. C. M. e de Voogd, N. J. (2019). The sponge microbiome within the greater coral reef microbial metacommunity. *Nat Commun.* 10(1), 1644.
- Cornish-Bowden, A. (2011). *History of Enzyme Chemistry*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

- Cowieson, A. J. e Ravindran, V. (2008). Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *Br. Poult. Sci.* 49(1), 37–44.
- De Santi, C., Ambrosino, L., Tedesco, P., Zhai, L., Zhou, C., Xue, Y., Ma, Y. e de Pascale, D. (2015). Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from a Tibetan glacier metagenomic library. *Biotechnol. Prog.* 31(4), 890–899.
- Dhamodharan, D., Naine, S. J., Keziah, S. M. e Devi, C. S. (2019). Novel fibrinolytic protease producing *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 from marine sponges. *Mar. Drugs.* 17(3), 164.
- Dionisi, H. M., Lozada, M. e Olivera, N. L. (2012). Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 46-90.
- Domingos, C., Moraes, F., e Muricy, G. (2013). Four new species of Plakinidae (Porifera: Homoscleromorpha) from Brazil. *Zootaxa* 3718, 530–544.
- Domingos, C., Lage, A. e Muricy, G. (2016). Overview of the biodiversity and distribution of the Class Homoscleromorpha in the Tropical Western Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 96(02), 379–389.
- Dos Santos, Y. Q., De Veras, B. O., De Franca, A. F. J., Gorchach-Lira, K., Velasques, J., Migliolo, L., e Dos Santos, E. A. (2018). A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine *Bacillus* sp. strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28(7), 1078-1085.
- Duarte, A. W., Dayo-Owoyemi, I., Nobre, F. S., Pagnocca, F. C. e Sette, L. D. (2013). Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles* 17(6), 1023-1035.
- Dunn, C. W., Hejnal, A., Matus, D. Q. Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sørensen, M. V., Haddock, S. H. D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R. M., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q. e Giribet, G. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452(7188), 745-749.
- Egan, S., James, S., Holmström, C. e Kjelleberg, S. (2002). Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ. Microbiol.* 4(8), 433-442.
- El-Bondkly, A. M. e El-Gendy, M. M. (2012). Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant strain of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 101(2), 331-46.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B. e Kunamneni, A. (2002). A review on microbial alkaline proteases. *J. Sci. Ind. Res. India* 61, 690-704.
- Ereskovsky, A. V., Borchiellini, C., Gazave, E., Ivanisevic, J., Lapébie, P., Pérez, T., Renard, E. e Vacelet, J. (2009). The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *BioEssays* 31, 89–97.
- Ereskovsky, A. V. (2010). Development of Homoscleromorpha of the Order Homosclerophorida Dendy, 1905. In: *The Comparative Embryology of Sponges*, eds. (Nova York: Springer), pp. 177–208.
- Ereskovsky, A. V., Lavrov, D. V. e Willenz, P. (2013). Five new species of Homoscleromorpha (Porifera) from the Caribbean Sea and re-description of *Plakina jamaicensis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 94(02), 285–307.
- Fang, W., Xue, S., Deng, P., Wang, X., Xiao, Y. e Fang, Z. (2019). AmyZ1: a novel α -amylase from marine bacterium *Pontibacillus* sp. ZY with high activity toward raw starches. *Biotechnol. Biofuels* 12(1), 95.
- Faulkner, D. J. (2000). Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.* 17, 1-6.
- Feby, A. e Nair, S. (2010). Sponge-associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1(4), 330-337.
- Ferrer, M., Méndez-García, C., Bargiela, R., Chow, J., Alonso, S., García-Moyano, A., Bjerga, G., Steen, I., Schwabe, T., Blom, C., Vester, J., Weckbecker, A., Shahgaldian, P., de Carvalho, C., Meskys, R., Zanolli, G., Glockner, F., Fernández-Guerra, A., Thambisetty, S., de la Calle, F., Golyshina, O., Yakimov, M., Jaeger, K., Yakunin, A., Streit, W., McMeel, O., Calewaert, J., Tonné, N. e Golyshin, P.

(2019). Decoding the ocean's microbiological secrets for marine enzyme biodiscovery. *FEMS Microbiol. Lett.* 366(1), fny285.

Freitas-Silva, J., Silva-Oliveira, T., Muricy, G. e Laport, M. S. (2020). *Bacillus* strains associated to Homoscleromorpha sponges are highly active against multidrug resistant bacteria. *Curr. Microbiol.* 77, 807-815.

Fu, X. T., Pan, C. H., Lin, H. e Kim, S. M. (2009). Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, AgaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(3), 257-264.

Fu, X. T. e Kim, S. M. (2010). Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs*, 8(1), 200–218.

Gao, Z., Ruan, L., Chen, X., Zhang, Y. e Xu, X. (2010). A novel salt-tolerant endo- β -1, 4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(4), 1373-1382.

Gaonkar, S. K. e Furtado, I. J. (2018). Isolation and culturing of protease- and lipase-producing *Halococcus* agarilyticus GUGFAWS-3 from marine *Haliclona* sp. inhabiting the rocky intertidal region of Anjuna in Goa, India. *Ann. Microbiol.* 68, 851–861.

Gaonkar, S. K. e Furtado, I. J. (2020). Characterization of extracellular protease from the haloarcheon *Halococcus* sp. strain GUGFAWS-3 (MF425611). *Curr. Microbiol.* 77(6), 1024-1034.

Gazave, E., Lapébie, P., Renard, E., Vacelet, J., Rocher, C., Ereskovsky, A. V., Lavrov, D. V. e Borchiellini, C. (2010). Molecular Phylogeny Restores the Supra-Generic Subdivision of Homoscleromorph Sponges (Porifera, Homoscleromorpha). *PLoS ONE*, 5(12), e14290.

Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P. e Borchiellini, C. (2012). No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia*, 687(1), 3–10.

Gazave, E., Lavrov, D. V., Cabrol, J., Renard, E., Rocher, C., Adamska, M., Borchiellini, C. e Ereskovsky, A. V. (2013). Systematics and Molecular Phylogeny of the Family Oscarellidae (Homoscleromorpha) with Description of Two New Oscarella Species. *PLoS ONE*, 8(5), e63976.

Ghanbarzadeh, M., Golmoradzadeh, A. e Homaei, A. (2018). Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes. *Phytochem. Rev.* 1–37.

Global Markets Insights. (2020). Global Enzymes Market Growth 2018-2024 Industry Share Analysis. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/press-release/enzymes-market.html#:~:text=According%20to%20a%20new%20report,reach%20%2410%2C519%20million%20in%202024%2C>. Acesso em 28/04/2020.

Gloeckner, V., Hentschel, U., Ereskovsky, A.V. e Schmitt, S. (2013). Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). *Mar. Bio.* 160, 781–791.

Gloeckner, V., Wehrli, M., Moitinho-Silva, L., Gernert, C., Schupp, P., Pawlik, J. R., Lindquist, N. L., Erpenbeck, D., Wörheide, G. e Hentschel, U. (2014). The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscopical survey of 56 sponge species. *Biol. Bull.*, 227, 78-88.

Goeij, J. M., Van Oevelen, D., Vermeij, M. J., Osinga, R., Middelburg, J. J., De Goeij, A. F. e Admiraal, W. (2013). Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. *Science*, 342(6154), 108-110.

Grenier, M., Ruiz, C., Lage, A. e Perez, T. (2020). New cave-dwelling *Plakina* (Plakinidae, Homoscleromorpha, Porifera) from Martinique Island (French Antilles). *Zootaxa*, 4729(1), 92-104.

Gupta, V., Singh, J., Bala, R. e Magazine, R. (2003). Recombinant DNA therapy in medicine. *JK Practitioner*, 10(4), 315-318.

Guisan, J.M., Bolivar, J.M., López-Gallego, F. e Rocha-Martín, J. (2020). New Opportunities for Immobilization of Enzymes. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Chapter 1, Second Edition. (Espanha: Humana Press), pp. 1-13.

Gupta, R., Gupta, N. e Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(6), 763–781.

- Gupta, S. K., Katakai, S., Chatterjee, S. Prasad, R. K., Datta, S., Vairale, M. G., Sharma, S., Dwivedi, S. K. e Gupta, D. K. (2020). Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. *J. Clean. Prod.* 258, 120351.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. e Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–18.
- Gurvan, M., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. e Helbert, W. (2006). Bioconversion of red seaweed galactans: A focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 23–33.
- Hafizah, N. F., Thu, A. H., Furusawa, G. (2019). Biochemical characterization of thermostable and detergent-tolerant β -agarase, PdAgaC, from *Persicobacter* sp. CCB-QB2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187(3), 770–781.
- Han, W., Cheng, Y., Wang, D., Wang, S., Liu, H., Gu, J. e Li, F. (2016). Biochemical characteristics and substrate degradation pattern of a novel exo-type β -agarase from the polysaccharide-degrading marine bacterium *Flammeovirga* sp. strain MY04. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(16), 4944-4954.
- Hankin, L. e Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67, 597-607.
- Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D. e Cockell, C. S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol.* 21(4), 204–212.
- Harshvardhan, K., Mishra, A. e Jha, B. (2013). Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 93, 51–56.
- Hassan, S. W. M., Abd El Latif, H. H. e Ali, S. M. (2018). Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. *Front. Microbiol.* 9.
- Helistö, P. e Korpela, T. (1998). Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb. Technol.* 23(1-2), 113–117.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J. e Horn, M. (2003). Microbial diversity of marine sponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 37, 59-88.
- Hentschel, U., Usher, K.M. e Taylor, M.W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 167-177.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M. e Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(9), 641–654.
- Hinojosa, V. S., Asenjo, J. e Leiva, S. (2018). Agarolytic culturable bacteria associated with three antarctic subtidal macroalgae. *World J. Microbiol. Biot.* 34(6), 73.
- Hitch, T. C. A. e Clavel, T. (2019). A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. *PeerJ Preprints* 7, e27725v1.
- Homaei, A. (2015). Purification and biochemical properties of highly efficient alkaline phosphatase from *Fenneropenaeus merguensis* brain. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 118, 16–22.
- Hong, S. J., Lee, J. H., Kim, E. J., Yang, H. J., Park, J. e Hong, S. (2017). Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagarooligosaccharides on high-fat diet-induced obesity in mice. *Mar. Drugs.* 15(4), 90.
- Hooper, J. N. e van Soest, R. W. (2002). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges.* In: *Systema Porifera, First Edition.* (Springer US), pp. 1-7.
- Hu, Z., Lin, B. K., Xu, Y., Zhong, M. Q. e Liu, G. M. (2009). Production and purification of agarase from a marine agarolytic bacterium *Agarivorans* sp. HZ105. *J. Appl. Microbiol.* 106(1), 181–190.
- Hunt, D. E., Gevers, D., Vahora, N. M. e Polz, M. F. (2008). Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(1), 44-51.
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A. e Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* 4:e1000255.

- Huston, A. L. (2008). Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes. In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 347-363.
- Imhoff J. F. e Stöhr R. (2003). Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. In: Müller W.E.G. (eds) Sponges (Porifera). Prog. Mol. Subcell. Biol., Volume 37, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 35-57.
- Imhoff, J. F., Labes, A. e Wiese, J. (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. Biotechnol. Adv. 29(5), 468–482.
- Indraningrat, A. A. G., Smidt, H. e Sipkema, D. (2016). Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. Mar. Drugs, 14(5), 87.
- Isaksen, M.F., Cowieson, A. e Kragh, K.M. (2010). Starch- and protein-degrading enzymes: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. Enzym. Farm. Animal Nutri. 2, 85-95.
- Islam, F. e Roy, N. (2019). Isolation and characterization of cellulase-producing bacteria from sugar industry waste. American J. BioScience, 7(1), 16-24.
- Ivanova, E. P., Shevchenko, L. S., Sawabe, T., Lysenko, A. M., Svetashev, V. I., Gorshkova, N. M., Satomi, M., Christen, R. e Mikhailov, V. V. (2002). *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52(1), 263-271.
- Jahromi, S. T. e Barzkar, N. (2018). Future direction in marine bacterial Starch- and protein-degrading enzymes: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use agarases for industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(16), 6847-6863.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Hussain, S., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A. e Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. Prog. Biophys. Mol. Biol. 132, 23–34.
- Jensen, P. R. e Fenical, W. (1996). Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. J. Ind. Microbiol. Biot. 17(5-6), 346–351.
- Jiang, Q., Zhao, Y., Zhang, X., Yang, X., Chen, Y., Chu, Z., Ye, Q., Li, X., Yin, Z. e You, J. (2019). Surface passivation of perovskite film for efficient solar cells. Nature Photonics, 13(7), 460-466.
- Jung, C., Kwon, H., Park, C. e Lee, J. (2012). Optimization of *Pseudoalteromonas* sp. JYBCL 1 culture conditions, medium composition and extracellular β -agarase activity. Biotechnol. Bioprocess Eng. 17(5), 937-945.
- Jung, S., Lee, C. R., Chi, W. J., Bae, C. H. e Hong, S. K. (2017). Biochemical characterization of a novel cold-adapted GH39 β -agarase, AgaJ9, from an agar-degrading marine bacterium *Gayadomonas joobiniege* G7. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(5), 1965-1974.
- Junior, A. N., da Silva Cardoso, V., Mansoldo, F. R. P., Cedrola, S. M. L., Mansur, M. C. P. R., Godoy, M. G. e Vermelho, A. B. (2020). A microplate assay for extracellular hydrolase detection. J. Microbiol. Methods, 175, 105948.
- Juturu, V. e Wu, J. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renew. Sust. Energ. Rev. 33. 188–203.
- Kamke, J., Sczyrba, A., Ivanova, N., Schwientek, P., Rinke, C., Mavromatis, K., Woyke, T. e Hentschel, U. (2013). Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. The ISME journal 7(12), 2287-2300.
- Kandra, L. (2003). α -Amylases of medical and industrial importance. J. Mol. Struct. (Theochem) 666–667, 487–498.
- Kang, S. e Kim, J. K. (2015). Reuse of red seaweed waste by a novel bacterium, *Bacillus* sp. SYR4 isolated from a sandbar. World J. Microb. Biotechnol. 31(1), 209-217.
- Kang, D. R., Yoon, G. Y., Cho, J., Lee, S. J., Park, J. H., Kang, T. H., Han, H. D., Park, W. S., Yoon, Y. K., Park, Y. M. e Jung, I. D. (2017). Neogargarooligosaccharides prevent septic shock by modulating A20- and cyclooxygenase-2-mediated interleukin-10 secretion in a septic-shock mouse model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 486(4), 998–1004.

- Karleskint, G., Tuner, R. e Small, J.W. (2010). Lower Invertebrates. In: Introduction to Marine Biology (Belmont: Cengage Learning), pp. 190–217.
- Karpushova, A., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S. e 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(1), 59-69.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. e Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr. Microbiol.* 57(5), 503–507.
- Kelly, R. M., Robinson, A. K. S., Blumentals, I. I., Brown, S. H. e Anfinsen, C. B. (1995). Proteolytic enzymes from hyperthermophilic bacteria and processes for their production, US5391489.
- Kim, B. J., Kim, H. J., Ha, S. D., Hwang, S. H., Byun, D. S., Lee, T. H. e Kong, J. Y. (1999). Purification and characterization of β -agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Biotechnol. Letters*, 21(11), 1011-1015.
- Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Arunkumar, M., Thangavelu, T. e Natarajaseenivasan, K. (2008). Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31(5), 483-492.
- Kiran, G. S., Sekar, S., Ramasamy, P., Thinesh, T., Hassan, S., Lipton, A. N., Ninawe, A. S. e Selvin, J. (2018). Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. *Mar. Environ. Res.* 140, 169-179.
- Krishnakumar, S., Bai, V. D. M. e Premkumar, J. (2015). Production of alpha amylase by salt-tolerant actinomycete *Streptomyces* sp. – SBU3 isolated from marine sponge. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 44(4), 583-588.
- Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., Pletschke, B. I., Singh, A. e Karp, M. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 55, 249-272.
- Lackner, G., Peters, E. E., Helfrich, E. J. N. e Piel, J. (2017). Insights into the lifestyle of uncultured bacterial natural product factories associated with marine sponges. *PNAS* 114(3), E347–E356.
- Lage, A., Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E. e Muricy, G. (2018a). Taxonomy of *Plakina* (Porifera: Homoscleromorpha) from Aegean submarine caves, with descriptions of three new species and new characters for the genus. *Mar. Biodiv.* 49, 727–747.
- Lage, A., Muricy, G., Ruiz, C. e Pérez, T. (2018b). New sciaphilic plakinids (Porifera, Homoscleromorpha) from the Central-Western Pacific. *Zootaxa*, 4466(1), 8.
- Lakshmikanth, M., Manohar, S., Souche, Y. e Lalitha, J. (2006). Extracellular β -agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(10), 1087-1094.
- Laport, M. S., Bauwens, M., de Oliveira Nunes, S., Willenz, P., George, I. e Muricy, G. (2017). Culturable bacterial communities associated to Brazilian *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha) and their antagonistic interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 489-499.
- Laport, M. S. (2018). Isolating Bacteria from Sponges: Why and How? *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18, 1224-1236.
- Lau, S. C., Tsoi, M. M., Li, X., Dobretsov, S., Plakhotnikova, Y., Wong, P. K. e Qian, P. Y. (2005). *Pseudoalteromonas spongiae* sp. nov., a novel member of the γ -Proteobacteria isolated from the sponge *Mycale adhaerens* in Hong Kong waters. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 55(4), 1593-1596.
- Lee, Y.K., Lee, J.H. e Lee, H.K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbiol.* 39, 254–264.
- Leema, R. T. e Sachindra, N. M. (2018). Purification and characterization of agarase from marine bacteria *Acinetobacter* sp. PS12B and its use for preparing bioactive hydrolysate from agarophyte red seaweed *Gracilaria verrucosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018;186(1):66-84.
- Lesser, M. P. e Slattery, M. (2020). Will coral reef sponges be winners in the Anthropocene?. *Global Change Biol.* 26(6), 3202-3211.

- Lévi, C., (1973). Systématique de la classe des Demospongiaria (Démospónges). In Grassé, P. P. (ed.), Spongiaires. Masson & Compagnie, Paris, pp. 577–632.
- Leys, S. P. e Hill, A. (2012). The physiology and molecular biology of sponge tissues. *Adv. Mar. Bio.* 62, 1–56.
- Li, J., Gu, X. e Pan, A. (2019). Multifunctional α -amylase Amy19 possesses agarase, carrageenase, and cellulase activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 585-594.
- Li, J., Han, F., Lu, X., Fu, X., Ma, C., Chu, Y. e Yu, W. (2007). A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with β -agarase. *Carbohydr. Res.* 342(8), 1030–1033.
- Li, J., Sha, Y., Seswita-Zilda, D., Hu, Q. e He, P. (2014). Purification and characterization of thermostable agarase from *Bacillus* sp. BI-3, a thermophilic bacterium isolated from hot spring. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(1), 19-25.
- Li, J. e Sha, Y. (2015). Expression and enzymatic characterization of a cold-adapted β -agarase from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ21. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 33(2), 319-327.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. e Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2, 1–11.
- Li, X., Dong, X., Zhao, C., Chen, Z. e Chen, F. (2003). Isolation and some properties of cellulose-degrading *Vibrio* sp. LX-3 with agar-liquefying ability from soil. *World J. Microbiol. Biot.* 19(4), 375-379.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F. e Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 603–613.
- Ma, L., Li, C., Yang, Z., Jia, W., Zhang, D. e Chen, S. (2013). Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *J. Biotechnol.* 166, 192–197.
- Maharsiwi, W., Astuti, R. I., Meryandini, A. e Wahyudi, A. T. (2020). Screening and characterization of sponge-associated bacteria from Seribu Island, Indonesia producing cellulase and laccase enzymes. *Biodiversitas J. Biol. Div.* 21(3).
- Malik, A. D. e Furtado, I. J. (2019a). Cellulase-free xylanase by *Halococcus thailandensis* GUMFAS7 and *Halorubrum saccharovororum* GUMFAS1—bionts of a sponge *Cinachyrella cavernosa*. *Microbiology* 88(2), 212-219.
- Malik, A. D. e Furtado, I. J. (2019b). *Haloferax sulfurifontis* GUMFAZ2 producing xylanase-free cellulase retrieved from *Haliclona* sp. inhabiting rocky shore of Anjuna, Goa-India. *J. Basic. Microbiol.* 59, 692-700.
- Margulis, L. e Fester, R. (1991). Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. Mit Press.
- Marinho, P. R., Moreira, A. P. B., Pellegrino, F. L. P. C., Muricy, G., Batos, M. C. F., Santos, K. R. N., Marval, M. G. e Laport, M. S. (2009). Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 678–682.
- McDonald, A. G., Boyce, S. e Tipton, K. F. (2009). ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic acids research*, 37, D593-D597.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31(3), 426–428.
- Miller, P. W., Pokutta, S., Mitchell, J. M., Chodaparambil, J. V., Clarke, D. N., Nelson, W. J., Weis, W. I. e Nichols, S. A. (2018). Analysis of a vinculin homolog in a sponge (phylum Porifera) reveals that vertebrate-like cell adhesions emerged early in animal evolution. *J. Bio. Chem.* 293(30), 11674–11686.
- Mohapatra, B., Banerjee, U. C. e Bapuji, M. (1998). Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol.* 60, 113-117.
- Mohapatra, B. R., Bapuji, M. e Sree, A. (2003). Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta. Biotechnol.* 23, 75-84.

- Moitinho-Silva, L., Nielsen, S., Amir, A., Gonzalez, A., Ackermann, G. L., Cerrano, C., Astudillo-Garcia, C., Easson, C., Sipkema, D., Liu, F., Steinert, G., Kotoulas, G., McCormack, G. P., Feng, G., Bell, J. J., Vicente, J., Björk, J. R., Montoya, J. M., Olson, J. B., Reveillaud, J., Steindler, L., Pineda, M., Marra, M. V., Ilan, M., Taylor, M. W., Polymenakou, P., Erwin, P. M., Schupp, P. J., Simister, R. L., Knight, R., Thacker, R. W., Costa, R., Hill, R. T., Lopez-Legentil, S., Dailianis, T., Ravasi, T., Hentschel, U., Li, Z., Webster, N. S. e Thomas, T. (2017a). The sponge microbiome project. *GigaScience*, 6, gix077.
- Moitinho-Silva, L., Steinert, G., Nielsen, S., Hardoim, C. C. P., Wu, Y., McCormack, G. P., López-Legentil, S., Marchant, R., Webster, N., Thomas T. e Hentschel, U. (2017b). Predicting the HMA-LMA Status in Marine Sponges by Machine Learning. *Front. Microbiol.* 8.
- Muricy, G. e Diaz, M. C. (2002). Order Homosclerophorida Dendy, 1905, Family Plakinidae Schulze, 1880. In: *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, Volume 1, eds. (Nova York: Kluwer Academic/Plenum Publishers), pp. 71–82.
- Muricy, G., Domingos, C., Lage, A., Lanna, E., Hardoim, C. C. P., Laport, M. S. e Zilberberg, C. (2019). Integrative taxonomy widens our knowledge of the diversity, distribution and biology of the genus *Plakina* (Homosclerophorida: Plakinidae). *Invertebr. Syst.* 33(2), 367-401.
- Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L. e Homaei, A. (2018). Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process. Biochem.* 70, 61–70.
- Nielsen, C. (2008). Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? *Evol. Dev.* 10(2), 241–257.
- Nielsen, C. (2012). Phylum Homoscleromorpha. In: *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*, ed. (Nova York: Oxford University Press Inc.), pp. 8–9.
- Nielsen, C. (2019). Early animal evolution: a morphologist's view. *R. Soc. open sci*, 6. 190638.
- Oh, C., Nikapitiya, C., Lee, Y., Whang, I., Kim, S. J., Kang, D. H. e Lee, J. (2010). Cloning, purification and biochemical characterization of beta agarase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. AG4. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(5), 483-494.
- Oh, Y. H., Jung, C. K. e Lee, J. W. (2011). Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(8), 818-821.
- Okamura, Y., Kimura, T., Yokouchi, H., Meneses-Osorio M., Katoh, M., Matsunaga T. e Takeyama, H. (2010). Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. *Mar. Biotechnol.* 12(4), 395-402.
- Oliveira, B. F. R., Cavalcanti, M. D. A., de Oliveira Nunes, S., Lobo, L. A., Domingues, R. M. C. P., Muricy, G. e Laport, M. S. (2019). *Paraclostridium* is the main genus of anaerobic bacteria isolated from new species of the marine sponge *Plakina* in the Brazilian Southeast coast. *Curr. Microbiol.* 76, 713-722.
- Oliveira, B. F. R. (2020a). “O holobionte *Plakina cyanorozea*: da diversidade procariótica à mineração genômica bacteriana por enzimas de interesse industrial”. Tese de Doutorado (Microbiologia) – Instituto de Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 356f.
- Oliveira, B. F. R., Carr, C., M., Dobson, A. D. W. e Laport, M. S. (2020b). Harnessing the sponge microbiome for industrial biocatalysts. *App. Microbiol. Biotechnol.* AMAB-D-20-01288.
- Oliveira, B. F. R., Lopes, I. R., Canellas, A. L. B., Carr, C., M., Dobson, A. D. W. e Laport, M. S. (in prep). Genomic and in silico protein structural analyses provide insights into marine polysaccharide-degrading enzymes in a sponge-derived *Pseudoalteromonas*.
- Panda, T. e Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(2), 160-169.
- Parages, M., Gutiérrez-Barranquero, J., Reen, F., Dobson, A. e O’Gara, F. (2016). Integrated (Meta) genomic and synthetic biology approaches to develop new biocatalysts. *Mar. Drugs.* 14(3), 62.
- Park, J., Hong, S. K. e Chang, Y. K. (2014). Production of DagA, a β -agarase, by *Streptomyces lividans* in glucose medium or mixed-sugar medium simulating microalgae hydrolysate. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(12), 1622-1628.

- Park, S. H., Lee, C. R. e Hong, S. K. (2020). Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(7), 2815-2832.
- Paulsen, S. S., Strube, M. L., Bech, P. K., Gram, L. e Sonnenschein, E. C. (2019). Marine chitinolytic *Pseudoalteromonas* represents an untapped reservoir of bioactive potential. *Msystems*, 4(4).
- Pechenik, J. A. (2015). The Poriferans and Placozoa. In: *Biology of the Invertebrates*. (Nova York: McGraw-Hill Education), pp. 77–94.
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Quéinnec, E., Silva, C., Wincker, P., Guyader, H., Leys, S., Jackson D. J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Worheide, G. e Manuel, M. (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr. Biol.* 19(8), 706-712.
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A. e Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 6(1), 46.
- Podell, S., Blanton, J. M., Neu, A., Agarwal, V., Biggs, J. S., Moore, B. S. e Allen, E. E. (2019). Pangenomic comparison of globally distributed Poribacteria associated with sponge hosts and marine particles. *The ISME J.* 13(2), 468–481.
- Pointing, S. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*. 2.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M. e Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *Biomed. Res. Int.* 2013, 264020.
- Punekar, N.S. (2018). Chapter Enzymes: Historical Aspects. In: *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. (Springer, Singapore), pp. 5-13.
- Quintanilla, D., Hagemann, T., Hansen, K. e Gernaey, K. V. (2015). Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production—Modelling and Monitoring. *Filaments in Bioprocesses* 29–54.
- Rahman, M. A., Culsum, U., Tang, W., Zhang, S. W., Wu, G. e Liu, Z. (2016). Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda*. *Enzym. Microb. Technol.* 85, 1–11.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A. e Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624-D632.
- Reiswig, H. M. (1975). Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Can. J. Zool.* 53(5), 582–589.
- Renard, E., Gazave, E., Fierro-Constain, L., Schenkelaars, Q., Ereskovsky, A.V., Vacelet, J., Borchiellini, C. (2013). Porifera (Sponges): recent knowledge and new perspectives. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, pp. 1–9.
- Robic, A., Ullmann, C., Auffray, P., Persillon, C. e Martin, J. (2017). Enzymes for industrial applications. *OCL*, 24(4), D404.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 59(0), 1–41.
- Rosenberg, E. e Zilber-Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and development: The hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews.* 93(1), 56–66.
- Rosenberg, E. e Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: The Hologenome Concept. *mBio* 7(2).
- Ruiz, C., Ivanišević, J., Chevaldonné, P., Ereskovsky, A. V., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Thomas, O. P. e Pérez, T. (2015). Integrative taxonomic description of *Plakina kanaky*, a new polychromatic sponge species from New Caledonia (Porifera: Homoscleromorpha). *Mar. Ecol.* 36, 1129-1143.
- Ruiz, C., Muricy, G., Lage, A., Domingos, C., Chenesseau, S. e Pérez, T. (2017). Descriptions of new sponge species and genus, including aspiculate Plakinidae, overturn the Homoscleromorpha classification. *Zool. J. Linnean Soc.* 179, 707–724.

- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S. e Benjamin, S. (2016). An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J. Nutri. Food Sci.* 6, 461.
- Sakamoto, Y., Suzuki, Y., Iizuka, I., Tateoka, C., Roppongi, S., Fujimoto, M., Inaka, K., Tanaka, H., Masaki, M., Ohta, K., Okada, H., Nonaka, T., Morikawa, Y., Nakamura, K. T., Ogasawara, W. e Tanaka, N. (2014). S46 Peptidases are the First Exopeptidases to be Members of Clan PA. *Scientific reports.* 4, 4977.
- Sana, B. (2013). Marine Microbial Enzymes: Biotechnological and Biomedical Aspects. *Mar. Microbiol.* 491–508.
- Sanchez, S. e Demain, A. L. (2017). Useful Microbial Enzymes - An Introduction. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 1–11.
- Santos, D. A., Oliveira, M. M., Curvelo, A. A. S., Fonseca, L. P. e Porto, A. M. S. (2017). Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. *Int. Biodeter. Biodegr.* 121, 66-78.
- Santos-Gandelman, J. F., Giambiagi-deMarval, M., Oelemann, W. M. R. e Laport, M. S. (2014a). Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 15, 143-155.
- Santos-Gandelman, J. F., Cruz, K., Crane, S., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., Barkay, T. e Laport, M. S. (2014b). Potential application in mercury bioremediation of a marine sponge-isolated *Bacillus cereus* strain Pj1. *Curr. Microbiol.*, 69, 374-380.
- Saranraj, P. (2014). Microbial Pectinases: A Review. *Global Journal of Traditional Medicinal Systems.*
- Sarkar, S., Pramanik, A., Mitra, A. e Mukherjee, J. (2010). Bioprocessing data for the production of marine enzymes. *Mar. Drugs*, 8(4), 1323-1372.
- Sathishkumar, R., Ananthan, G., Iyappan, K. e Stalin, C. (2015). A statistical approach for optimization of alkaline lipase production by ascidian associated - *Halobacillus trueperi* RSK CAS9. *Biotechnol. Rep.* 8, 64–71.
- Sayali, P. e Satpute, S. (2013). Microbial Esterases: An overview. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2, 135-146.
- Schafer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L. D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H. P., Poulsen, P. B., Lund, H., Oxenbøll, K. M., Wu, G. . F., Pedersen, H. H. e Xu, H. (2007). Industrial enzymes. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 10559-131.
- Schleper, C., Swanson, R. V., Mathur, E. J. e DeLong, E. F. (1997). Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* 179(24), 7803-11.
- Schmitt, S., Hentschel, U. e Taylor, M.W. (2012). Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. *Hydrobiologia* 687, 341–351.
- Schulze, F. E. (1880). Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien. Neunte Mittheilung. Die Plakiniden. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie Abt A.* 34, 407–451.
- Selvin, E., Steffes, M. W., Zhu, H., Matsushita, K., Wagenknecht, L., Pankow, J., Coresh, J. e Brancati, F. L. (2010). Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N. Engl. J. Med.* 362(9), 800–811.
- Selvin, J., Kennedy, J., Lejon, D. P., Kiran, G. S. e Dobson, A. D. (2012). Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microb. Cell. Fact.* 11, 72.
- Shanmughapriya, S., Krishnaveni, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Thangavelu, T., Kiran, G. S. e Natarajaseenivasan, K. (2008). Optimization of extracellular thermotolerant alkaline protease produced by marine *Roseobacter* sp. (MMD040). *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31(5), 427-433.
- Shanmughapriya, S., Seghal, K. G., Selvin, J. e Gan R. (2009). Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 67-75.

- Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, T. A. e Rani, C. (2010). Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162(3), 625-640.
- Sibero, M. T., Igarashi, Y., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Trianto, A., Zilda, D. S. e Wijaya, Y. J. (2019). Sponge-associated fungi from a mangrove habitat in Indonesia: species composition, antimicrobial activity, enzyme screening and bioactive profiling. *Int. Aquat. Res.* 11, 173.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23, 15–22.
- Silva-Oliveira, T. (2017). Isolamento, identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de bactérias associadas às esponjas marinhas da classe Homoscleromorpha. Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 60f.
- Simister, R. L., Deines, P., Botté, E. S., Webster, N. S. e Taylor, M. W. (2012). Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ. Microbiol.* 14, 517-524.
- Simpson, T.L. (1984). Cellular Components of the Mesohyl. In: *The cell biology of sponges*, 1st ed. (Springer-Verlag, New York), pp.70-131.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., e Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 6, 174.
- Singh, R. S., Singh, T. e Pandey, A. (2019). Microbial Enzymes - An Overview. *Adv. Enzym. Technol.* 1–40.
- Song, Q., Wang, Y., Yin, C. e Zhang, X. H. (2016). Laa A, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031T. *Enzym. Microb. Technol.* 90, 83–92.
- Souza, P. M. e Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz. J. Microbiol.* 41(4), 850–861.
- Su, J., Zhang, F., Sun, W., Karuppiyah, V., Zhang, G., Li, Z. e Jiang, Q. (2015). A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(7), 1093-102.
- Sundarram, A. e Murthy, T. (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2. 166-175.
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P. e Kim, S. K. (2016). Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. *Adv. Food Nutr. Res.* 79, 161-177.
- Suzuki, H., Sawai, Y., Suzuki, T. e Kawai, K. (2003). Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci Bioeng.* 95(4), 328-334.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D. e Wagner, M. (2007). Sponge associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 295-347.
- The Novozymes Report. (2018). Disponível em: https://report2018.novozymes.com/-/media/Report-site-2018/PDF/The_Novozymes_Report_2018.pdf. Acesso em: 28/11/2020.
- Thenard, L. J. (1819). Nouvelles Recherches sur l'Eau Oxigénée *Ann. Chim. Phys.* 11: 85.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Bjork, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., Olson, J. B., Erwin, P. M., López-Legentil, S., Luter, H., Chaves-Fonnegra, A., Costa, R., Schupp, P. J., Steindler, L., Erpenbeck, D., Gilbert, J., Knight, R., Ackermann, G., Lopez, J. V., Taylor, M. W., Thacker, R. W., Montoya, J. M., Hentschell, U. e Webste, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nat. Commun.* 7, 11870.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. e Polz, M. F. (2004). Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7), 4103-4110.
- Thompson, J. R. e Polz, M. F. (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. In *The biology of vibrios*, American Soci. Microbiol. pp. 190-203.

- Tipton, K. (2019). Translocases (EC 7): A new EC Class. ExplorEnz - The Enzyme Database. Disponível em: <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>. Acesso em: 28/11/2020.
- Tiwari, R., Pranaw, K., Singh, S., Nain, P.K., Shukla, P. e Nain, L. (2016). Two-step statistical optimization for cold active β -glucosidase production from *Pseudomonas lutea* BG8 and its application for improving saccharification of paddy straw. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63, 659-668.
- Topsent, E. (1928). Spongiaires de l'Atlantique et de la Méditerranée provenant des croisières du Prince Albert Ier de Monaco. Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I. Monaco. 74, 1-376, pls I-XI.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M., Luccio, M. e Oliveira, J. (2009). A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol.* 3. 182-196.
- Trincone, A. (2011). Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. *Mar. Drugs* 9(4), 478–499.
- Trincone, A. (2012). Some enzymes in marine environment: prospective applications found in patent literature. *Recent Pat. Biotechnol.* 6(2), 134–148.
- Trincone, A. (2013). *Marine Enzymes for Biocatalysis, Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes*, 1st Edition.
- Trincone, A. (2017). Enzymatic processes in marine biotechnology. *Mar. Drugs*, 15(4), 93.
- Trincone, A. (2018). Update on Marine Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes: Biotechnological Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 901.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K. e Jha, B. (2011). An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 891-897.
- Trivedi, N., Gupta, V., Reddy, C. R. e Jha, B. (2013). Detection of ionic liquid stable cellulase produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. isolated from brown alga *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Bioresour. Technol.* 132:313-319.
- Trivedi, N., Reddy, C. R. e Lali, A. M. (2016). Marine Microbes as a Potential Source of Cellulolytic Enzymes. *Adv. Food. Nutr. Res.* 79, 27-41.
- Vacelet, J. (1975). Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell.* 23, 271–288.
- Vacelet, J., e Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 30, 301–314.
- Vacelet, J. e Duport, E. (2004). Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). *Zoomorphology*, 123(4), 179-190.
- Van der Meulen, H. J. e Harder, W. (1975). Production and characterization of the agarase of *Cytophaga flevensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 41(1), 431-447.
- van Soest, R.W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. e Hooper, J. N. A. (2012). Global diversity of sponges (Porifera), PLoS ONE, 7, e35105.
- van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Hooper, J. N. A., Rützler, K., de Voogd, N. J., Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A. B., Manconi, R., Schönberg, C., Klautau, M., Kelly, M., Vacelet, J., Dohrmann, M., Díaz, M. C., Cárdenas, P., Carballo, J. L., Ríos, P., Downey, R. e Morrow, C.C. (2020). World Porifera database. Disponível em <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=stats>. Acessado em 28/11/2020.
- Vera, J., Alvarez, R., Murano, E., Slebe, J. C. e Leon, O. (1998). Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4378-4383.
- Verma, P., Chatterjee, S., Keziah, M. S. e Devi, S. C. (2018). Fibrinolytic Protease from Marine *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 16(1), 44–55.

- Vishnyakov, A. E. e Ereskovsky, A.V. (2009). Bacterial symbionts as an additional cytological marker for identification of sponges without a skeleton. *Mar. Biol.* 156, 1625–1632.
- Yin, Z., Zhu, M., Davidson, E. H., Bottjer, D. J., Zhao, F. e Tafforeau, P. (2015). Sponge grade body fossil with cellular resolution dating 60 Myr before the Cambrian. *PNAS* 112(12), E1453–E1460.
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A. e Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech.* 7(1).
- Wagner, D. e Kelley, C. D. (2016). The largest sponge in the world? *Mar. Biodivers.* 47(2), 367–368.
- Wang, J. X., Jiang, X. L., Mou, H. J. e Guan, H. S. (2004). Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *J Appl Phycol* 16, 333–340.
- Wang, Y., Zhang, Y., Sun, A. e Hu, Y. (2016). Characterization of a novel marine microbial esterase and its use to make D-methyl lactate. *Chinese J. Catal.* 37(8), 1396–1402.
- Watanabe, S., Yamaoka, N., Fukunaga, N. e Takada, Y. (2002). Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and expression analysis of the cold-inducible isocitrate lyase gene from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles* 6, 397–405.
- Webster, N. S. e Taylor, M.W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ. Microbiol.* 14, 335-346.
- Webster, N. S. e Thomas, T. (2016). The Sponge Hologenome. *mBio*, 7(2).
- Wehrl, M., Steinert, M. e Hentschel, U. (2007). Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb. Ecol.* 53, 355-365.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. e Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2), 697–703.
- Weisz, J.B., Lindquist, N. e Martens, C.S. (2008). Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia* 155, 367–376.
- Wilkinson, C. R., Garrone, R. e Vacelet, J. (1984). Marine Sponges Discriminate between Food Bacteria and Bacterial Symbionts: Electron Microscope Radioautography and in situ Evidence. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 220(1221), 519–528.
- Wood, T. M. e Garcia-Campayo, V. (1990). Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1, 147-161.
- Wu, G., Zhang, X., Wei, L., Wu, G., Kumar, A., Mao, T. e Liu, Z. (2015a). A cold-adapted, solvent and salt tolerant esterase from marine bacterium *Psychrobacter pacificensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 180–187.
- Wu, S., Liu, G., Zhang, D., Li, C. e Sun, C. (2015b). Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1. *J. Basic Microbiol.* 55(12), 1427–1434.
- Wu, S., Lu, M., Chen, J., Fang, Y., Wu, L., Xu, Y. e Wang, S. (2016). Production of pullulan from raw potato starch hydrolysates by a new strain of *Auerobasidium pullulans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 740–743.
- Wu, Y. R., Mao, A., Sun, C., Shanmugam, S., Li, J., Zhong, M. e Hu, Z. (2017). Catalytic hydrolysis of starch for biohydrogen production by using a newly identified amylase from a marine bacterium *Catenovulum* sp. X3. *Int. J. Biol. Macromol.* 104(Pt A):716-723.
- Wulff, J.L. (2001). Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how? *Bull. Mar. Sci.* 69, 831–846.
- Yang, S. T., El-Enshasy, H. A. e Thongchul, N. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production and applications. In: *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. (John Wiley e Sons, Inc., Hoboken, NJ), pp. 131-146.
- Yun, E. J., Yu, S. e Kim, K. H. (2017). Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(14):5581-5589.

Yung, P. Y., Burke, C., Lewis, M., Kjelleberg, S. e Thomas, T. (2010). Novel antibacterial proteins from the microbial communities associated with the sponge *Cymbastela concentrica* and the green alga *Ulva australis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4), 1512–1515.

Zhang, C. e Kim, S. K. (2010). Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs* 8(6), 1920–1934.

Zhang, H., Zhang, F. e 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(7):1267-1274.

Zhang, N., Hou, E., Song, J., Li, J., Tang, Q. e Mao, X. (2017a). Neoagarotetraose-modulated gut microbiota and alleviated gut inflammation in antibiotic treatment mice. *Food Agri. Immunol.* 28(6), 1408-1423.

Zhang, N., Mao, X., Li, R. W., Hou, E., Wang, Y., Xue, C. e Tang, Q. (2017b). Neoagarotetraose protects mice against intense exercise-induced fatigue damage by modulating gut microbial composition and function. *Mol. Nutr. Food Res.* 61(8), 1600585.

Zhang, S. C., Sun, M., Li, T., Wang, Q., Hao, J., Han, Y., Hu, X. e Lin, S. (2011). Structure Analysis of a New Psychrophilic Marine Protease. *PLoS ONE*, 6(11), e26939.

Zhang, X., Lin, H., Wang, X. e Austin, B. (2018). Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—A review. *Sci. China Earth Sci.* 61(10), 1357-1368.

Zhao, X. Q. (2011). Genome-Based Studies of Marine Microorganisms to Maximize the Diversity of Natural Products Discovery for Medical Treatments. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011, 1–11.

Zilber-Rosenberg, I. e Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 5, 723–735.

ANEXO I – Meios de cultura**ASW (do inglês, “*artificial seawater*”, água do mar artificial)**

NaCl.....	23,38 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	4,07 g
CaCl ₂ .H ₂ O.....	1,47 g
KCl.....	0,75 g
NaHCO ₃	0,17 g
Ágar.....	15,0 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Meio de isolamento de Hu: ASW + Ágar 1,5% (m/v) (Hu *et al.*, 2008)

NaCl.....	23,38 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	4,07 g
CaCl ₂ .H ₂ O.....	1,47 g
KCl.....	0,75 g
NaHCO ₃	0,17 g
Ágar.....	15,0 g
ASW q.s.p.....	1.000 mL

ASW = (do inglês, “*artificial seawater*”, água do mar artificial).

Meio de produção da agarase (Hinojosa, Asenjo e Leiva, 2018)

Peptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Ágar.....	2,0 g

Red Sea Salts.....	33,0 g
pH.....	7,2 ± 0,2
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Ágar CMC (Kasana *et al.*, 2008)

NaNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
Peptona.....	0,2 g
Carboximetilcelulose.....	2,0 g
Ágar.....	15,0 g
pH.....	7,2 ± 0,2
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Meio A1 (DSMZ Medium 1054) (Atlas, 2010)

Amido.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
Bacto peptona.....	2,0 g
Ágar.....	15,0 g
ASW q.s.p.....	1.000 mL

Meio de Sierra (Sierra, 1957)

Peptona.....	10,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,1 g

Ágar.....	15,0 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Detalhes no preparo: Ao meio recém-esterilizado e a uma temperatura de 50°C, acrescentar Tween 80 (substrato para lipase) e Tween 20 (substrato para esterase) a uma concentração final de 1,0% (v/v).

Skim Milk Agar (Atlas, 2010)

Peptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Leite desnatado em pó.....	1,0 g
Ágar.....	15,0 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Meio basal para triagem de β-glicosidase (Atlas, 2010)

Triptona.....	10,0 g
NaCl.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Esculina.....	2,0 g
Citrato férrico de amônio.....	2,5 g
Ágar.....	15,0 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Meios para produção do extrato bruto enzimático de celulase

Meio basal de tolerância suplementando com CMC (Triveldi *et al.*, 2011)

Extrato de levedura.....	5 g
CMC.....	15 g

ASW..... 1.000 mL

LB ajustado com NaCl (3.0%) e CMC (1,0%)

Triptona..... 10 g

Extrato de levedura..... 5 g

NaCl..... 30 g

CMC..... 10 g

H₂O deionizada q.s.p..... 1.000 mL

Meios para produção do extrato bruto enzimático de agarase

Meios de produção de agarase (Oh *et al.*, 2011)

Extrato de levedura..... 0,5 g

NaCl..... 5 g

(NH₄)₂SO₄..... 1 g

K₂HPO₄..... 2 g

CaCl₂.H₂O..... 0,02 g

MgCl₂.6H₂O..... 0,2 g

Ágar..... 1 g

H₂O deionizada q.s.p..... 1.000 mL

Meio ótimo (Jung *et al.* 2012)

NaCl..... 15 g

(NH₄)₂SO₄..... 1 g

K₂HPO₄..... 2 g

Ágar..... 3 g

CaCl₂.H₂O..... 0,02 g

MgCl₂.6H₂O..... 0,2 g
Tryptona..... 10 g
H₂O deionizada q.s.p..... 1.000 mL

Meio otimizado (Fu *et al.*, 2009)

Extrato de levedura..... 2,7 g
Ágar..... 2,3 g
ASW q.s.p..... 1.000 mL

ANEXO II – Tampões e Reagentes**PBS 1X (pH 7,4)**

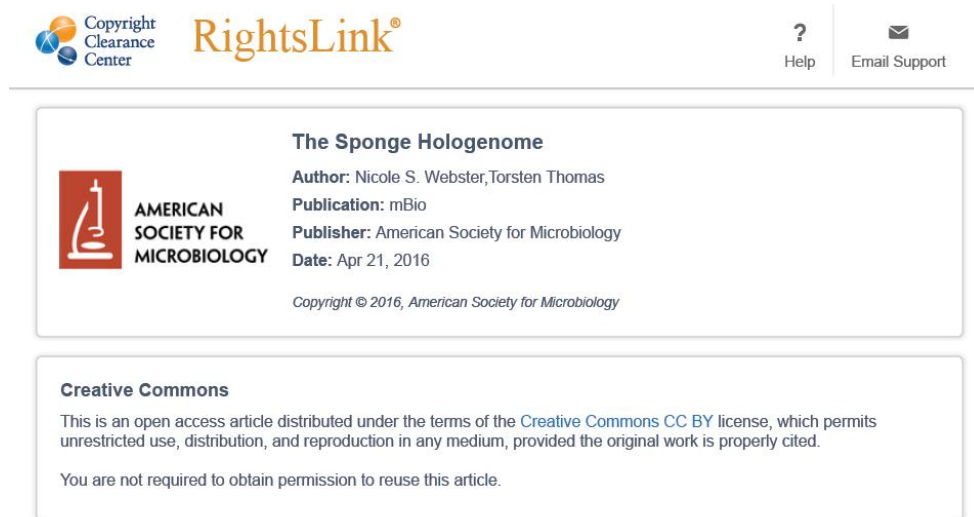
NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

Tampão Fosfato de Sódio (10 mM, pH 7.4)

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	2,021 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	0,339 g
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

ANEXO III – Autorização para uso das imagens na Introdução

Figura 1 - Anatomia geral do corpo de uma esponja marinha adulta. (A) Esquema representativo macroscópico geral simplificado. A água do mar entra pelos óstios pelo fluxo gerado pelo batimento dos flagelos dos coanócitos e segue pelo sistema aquífero da esponja, saindo pelo ósculo. (B) Visão microscópica com a organização das camadas celulares; observar a presença significativa de microrganismos simbiotes no mesoílo (Fig.1A: Adaptado de Webster e Thomas, 2016. Fig.1B: Adaptado de Hentschel *et al.*, 2012; autorização de uso no Anexo III).



The screenshot shows the RightsLink interface for the article "The Sponge Hologenome". At the top, there are logos for Copyright Clearance Center and RightsLink, along with "Help" and "Email Support" links. The article information is displayed in a box with the American Society for Microbiology logo. Below this, a Creative Commons section explains the license terms.

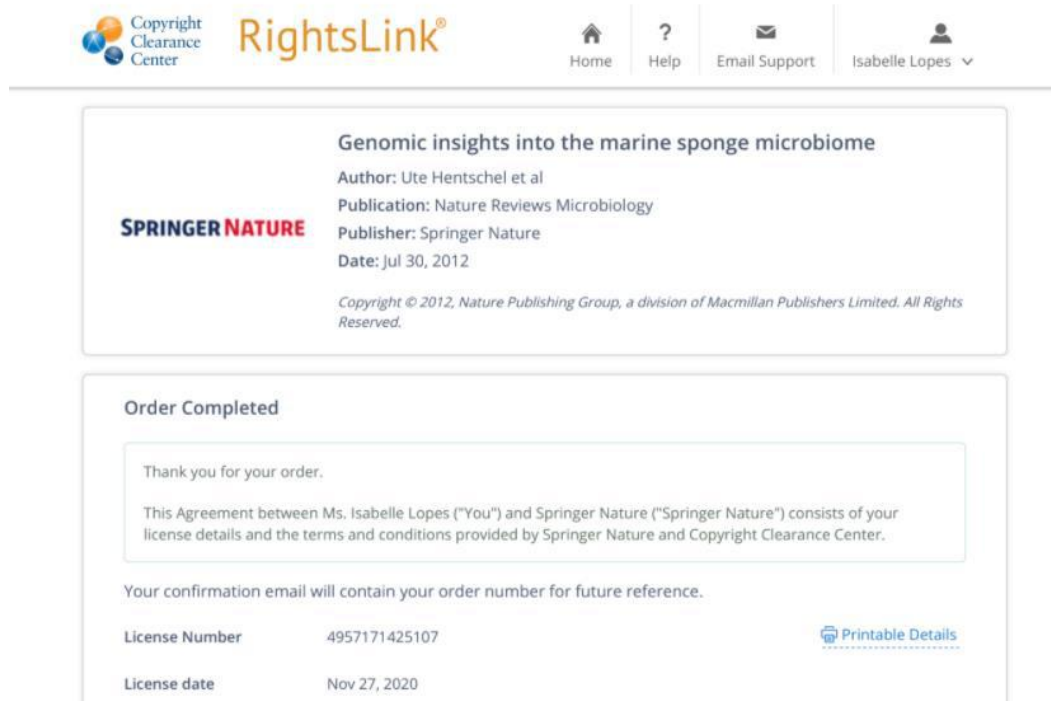
Copyright Clearance Center **RightsLink®** ? Help Email Support

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

The Sponge Hologenome
 Author: Nicole S. Webster, Torsten Thomas
 Publication: mBio
 Publisher: American Society for Microbiology
 Date: Apr 21, 2016
 Copyright © 2016, American Society for Microbiology

Creative Commons
 This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
 You are not required to obtain permission to reuse this article.

Webster, N. S. e Thomas, T. (2016). The Sponge Hologenome. mBio, 7(2).



The screenshot shows the RightsLink interface for the article "Genomic insights into the marine sponge microbiome". At the top, there are logos for Copyright Clearance Center and RightsLink, along with "Home", "Help", "Email Support", and a user profile for "Isabelle Lopes". The article information is displayed in a box with the Springer Nature logo. Below this, an "Order Completed" section provides a thank you message and license details.

Copyright Clearance Center **RightsLink®** Home ? Help Email Support Isabelle Lopes

SPRINGER NATURE

Genomic insights into the marine sponge microbiome
 Author: Ute Hentschel et al
 Publication: Nature Reviews Microbiology
 Publisher: Springer Nature
 Date: Jul 30, 2012
 Copyright © 2012, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Ms. Isabelle Lopes ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 4957171425107 [Printable Details](#)

License date Nov 27, 2020

Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M. e Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. Nat. Rev. Microbiol. 10(9), 641–654.

Figura 4 - Riqueza microbiana de OTU (Operational Taxonomic Unit) em comunidades associadas a esponjas em relação a filo. Perfil taxonômico do microbioma de 81 espécies diferentes de esponjas do SMP (Moitinho-Silva *et al.*, 2017a) obtido por meio de técnicas independentes de cultivo. Foram observados 39 filos entre os domínios Bacteria e Archaea (Adaptado de Pita *et al.*, 2018; autorização de uso no Anexo III).



The screenshot shows the top navigation bar with the Copyright Clearance Center and RightsLink logos on the left, and a Help icon and an Email Support icon on the right. Below the navigation bar is a white box containing the article title "The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems" and the author "Author: L. Pita et al". To the left of the author information is the Springer Nature logo. Below the author information are the publication details: "Publication: Microbiome", "Publisher: Springer Nature", and "Date: Mar 9, 2018". At the bottom of this box is the copyright notice "Copyright © 2018, The Author(s)". Below this box is another white box titled "Creative Commons" which contains the text: "This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited." and "You are not required to obtain permission to reuse this article. CC0 applies for supplementary material related to this article and attribution is not required."

Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A. e Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 6(1):46.

ANEXO IV – Certificados



Certificamos que o trabalho RASTREAMENTO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA MICROBIOTA CUTÂNEA DE TUBARÃO (*CARCHARHINUS LONGIMANU*, *CARCHARIAS TAURUS* E *GINGLYMOSTOMA CIRRATUM*), de autoria de ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e RAQUEL PEIXOTO, orientado por MARINELLA SILVA LAPORT foi apresentado na 8ª Semana de Integração Acadêmica realizada de 23 a 27 de outubro de 2017 na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 02 de Janeiro de 2018


Prof. Eduardo Gonçalves Serra
Pró-Reitor de Graduação


Prof. Leila Rodrigues da Silva
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa


Prof. Maria Mello de Malta
Pró-Reitora de Extensão

REALIZAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PR-1 | Pró-Reitoria de Graduação
PR-2 | Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
PR-5 | Pró-Reitoria de Extensão

PATROCÍNIO



APOIO





15^a
21
OUT

9^A SEMANA DE
INTEGRAÇÃO
ACADÊMICA
DA UFRJ

40ª JORNADA GIULIO MASSARANI DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA,
TECNOLÓGICA, ARTÍSTICA E CULTURAL
15º CONGRESSO DE EXTENSÃO DA UFRJ
10ª JORNADA DE PESQUISA E EXTENSÃO DO CAMPUS UFRJ-MACAE
5ª JORNADA DE FORMAÇÃO DOCENTE - PIBID/UFRJ
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - SNCT/UFRJ 2018

www.siac.ufrj.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS HIDROLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DA ESPONJA MARINHA PLAKINA SP. DO LITORAL DE CABO FRIO (RJ)., de autoria de ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA, ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, GUILHERME RAMOS DA SILVA MURICY e WALTER MARTIN ROLAND OELEMANN, orientado por MARINELLA SILVA LAPORT foi apresentado no formato PÔSTER durante a 9ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2018

Prof. Eduardo Gonçalves Serra
Pró-Reitor de Graduação

Prof. Leila Rodrigues da Silva
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa

Prof. Maria Mello de Malta
Pró-Reitora de Extensão

REALIZAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PR-1 | Pró-Reitoria de Graduação
PR-2 | Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
PR-5 | Pró-Reitoria de Extensão

PATROCÍNIO



APOIO





15^a
21
OUT

9^a SEMANA DE
INTEGRAÇÃO
ACADÊMICA
DA UFRJ

40ª JORNADA GIULIO MASSARANI DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA,
TECNOLOGICA, ARTÍSTICA E CULTURAL
15º CONGRESSO DE EXTENSÃO DA UFRJ
10ª JORNADA DE PESQUISA E EXTENSÃO DO CAMPUS UFRJ-MACAE
5ª JORNADA DE FORMAÇÃO DOCENTE - PIBID/UFRJ
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - SNCT/UFRJ 2018

www.siac.ufrj.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO DAS ÁGUAS DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, de autoria de ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e WELLINGTON FELIPE DA COSTA, orientado por RODOLFO PARANHOS e MARINELLA SILVA LAPORT foi apresentado no formato PÔSTER durante a 9ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2018

Prof. Eduardo Gonçalves Serra
Pró-Reitor da Graduação

Prof. Leila Rodrigues da Silva
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa

Prof. Maria Mello de Malta
Pró-Reitora de Extensão

REALIZAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PR-1 | Pró-Reitoria de Graduação
PR-2 | Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
PR-5 | Pró-Reitoria de Extensão

PATROCÍNIO



Fundação Universitária
José Bonifácio



FAPERJ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

APOIO



A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 67XLX7.



21^a
27
OUT

10^A

SEMANA DE
INTEGRAÇÃO
ACADÊMICA
DA UFRJ

51^ª SEMANA GUILHERME RAMOS DE MOURÃO (CIÊNCIAS,
TECNOLOGIA, ARQUITETURA E CULTURA)
51^ª SEMANA DE EXTENSÃO DA UFRJ
51^ª SEMANA DE PESQUISA E EXTENSÃO DO CAMPUS UFRJ MARCÁ
51^ª SEMANA DE FORMAÇÃO SOCINTE - PÓS-GRADU
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - SNEC/UFRJ 2019

www.10ao.ufrj.br

CERTIFICADO

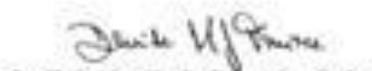
Certificamos que o trabalho ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS À ESPONJA MARINHA PLAKINA CYANOROSEA DO LITORAL DE CABO FRIO (RJ), foi apresentado no formato PÓSTER na 10ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.


Autores: ISABELLE RODRIGUES LOPES, ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e GUILHERME RAMOS DA SILVA MURICY

Orientadores: MARINELLA SILVA LAPORT,

Rio de Janeiro, 13 de Dezembro de 2019


Prof. Gisela Viana Pires
Pró-Reitora de Graduação


Prof. Denise Maria Guimarães Freire
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa


Prof. Ivana Bentes Oliveira
Pró-Reitora de Extensão

REALIZAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PR-1 | Pró-Reitoria de Graduação
PR-2 | Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
PR-3 | Pró-Reitoria de Extensão

APOIO





Certificamos que o trabalho ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO DAS ÁGUAS DA BAÍA DA GUANABARA, RIO DE JANEIRO foi apresentado no formato PÔSTER na 10ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ.

Autores: ANNA LUIZA BAUER CANELLAS, ISABELLE RODRIGUES LOPES, BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA e RODOLFO PARANHOS

Orientadores: MARINELLA SILVA LAPORT.

Rio de Janeiro, 13 de Dezembro de 2019


Profª. Gisele Viana Pires
Pró-Reitora de Graduação


Profª. Denise Maria Guimarães Freire
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa


Profª. Ivana Bentes Oliveira
Pró-Reitora de Extensão

REALIZAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PR-1 | Pró-Reitoria de Graduação
PR-2 | Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
PR-5 | Pró-Reitoria de Extensão

APOIO



A autenticidade deste certificado pode ser confirmada através do seguinte endereço: <https://certificados.sistemasiac.ufrj.br/verificar/>, digitando-se o seguinte código: 9KRZY4 .



II Feira de Inovação Biotecnológica
do IMPG e FIOCRUZ

Certificado

Certificamos que
Isabelle Rodrigues Lopes

Participou da 2ª Feira de Inovação Biotecnológica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), nos dias 10 e 11 de dezembro de 2019, no Auditório Rodolpho Paulo Rocco, UFRJ.

Rio de Janeiro, 11/12/2019.

Alane Beatriz Vermelho - Coordenadora Geral da
2ª Feira de Inovação Biotecnológica IMPG/FIOCRUZ

Marco Aurélio Krieger - Vice-presidente de Produção
e Inovação em Saúde (VPPIS) da FIOCRUZ



Se otorga el presente certificado a:

Marinella Laport (autor), Suzanne O. Nunes, Wellington F. Costa, Thiago S. Oliveira, Anna Luiza B. Canellas, Heloísa S. Rosa, Felix R. Jhonatan, Isabelle R. Lopes, Jéssyca Freitas-Silva, Bruno Francesco R. Oliveira, Gabriela C.R. Puccinelli, Guilherme Muricy

Por haber participado como expositor en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018 realizado del 13 al 16 de Noviembre de 2018, Santiago, Chile.

Presentando el trabajo titulado:

Antibiotic resistance genes and substances with biotechnological potential in bacteria isolated from sponges and seawater

Dra. Claudia Saavedra
Presidenta
Comité Organizador ALAM 2018

Dr. Renato Chavez
Comité Organizador
ALAM 2018





Universidade Federal
do Rio de Janeiro



CERTIFICADO

Certificamos que **ISABELLE LOPES RODRIGUES** apresentou o trabalho intitulado “**Análise da produção de hidrolase por bactérias associadas à esponja marinha *Plakina cyanorosea* do litoral de Cabo Frio (RJ)**” na *XXVI Semana de Microbiologia e Imunologia*, realizada pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da UFRJ, durante o Mês Nacional da Ciência, Tecnologia e Inovações (MNCT). O evento ocorreu de forma online, no período entre os dias 19 e 23 de Outubro de 2020.

Rio de Janeiro, 27 de Outubro de 2020.

Coautores: Anna Luiza Bauer Canellas, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, Guilherme Muricy e Marinella Silva Laport

Prof. Beatriz Meurer Moreira
Diretora do IMPG

Prof. Gabriella Mendes
Coordenadora do Evento



Universidade Federal
do Rio de Janeiro



MENÇÃO HONROSA



A *XXVI Semana de Microbiologia e Imunologia* atribui *menção honrosa* ao trabalho intitulado “**Análise da produção de hidrolase por bactérias associadas à esponja marinha *Plakina cyanorosea* do litoral de Cabo Frio (RJ)**” apresentado por **ISABELLE LOPES RODRIGUES**. O evento foi realizado pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da UFRJ, durante o Mês Nacional da Ciência, Tecnologia e Inovações (MNCT). O evento ocorreu de forma online, no período entre os dias 19 e 23 de Outubro de 2020.

Rio de Janeiro, 27 de Outubro de 2020.

Coautores: Anna Luiza Bauer Canellas, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, Guilherme Muricy e Marinella Silva Laport

Prof. Beatriz Meurer Moreira
Diretora do IMPG

Prof. Gabriella Mendes
Coordenadora do Evento

ANEXO V: Autoria e Coautoria em Artigos Científicos

Artigo submetido à revista científica Revista da Biologia, Universidade Federal de São Paulo (USP).



Ficha de identificação
Revista da Biologia – Versão em Português

1ª página

Tipo do Texto: Revisão
(Artigo de Pesquisa, Método ou Revisão?)

Área: Genética e Biologia Molecular
Seção: Microbiologia

Título

Versão em Português: **Microorganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes**

Versão em Inglês: **Marine microorganisms: a reservoir of biotechnologically interesting hydrolases**

Nomes dos autores: Isabelle Rodrigues Lopes¹, Anna Luiza Bauer Canellas¹, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira¹, Marinella Silva Laport¹

Coautoria em artigo submetido à revista científica Revista da Biologia, Universidade Federal de São Paulo (USP).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Ficha de identificação
Revista da Biologia – Versão em Português

1ª página

Tipo do Texto: Revisão

Área: Microbiologia

Título

Versão em Português: **O gênero *Vibrio*: conceitos atuais e novas perspectivas**

Versão em Inglês: **The genus *Vibrio*: current concepts and new perspectives**

Nomes dos autores: Anna Luiza Bauer Canellas¹, Isabelle Rodrigues Lopes¹, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira¹, Marinella Silva Laport¹

Coautoria em artigo publicado na revista científica *Microorganisms*.



Coautoria em artigo submetido à revista científica *Environmental Pollution*.

ENVIRONMENTAL POLLUTION Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: Anna Luiza Bauer Canellas

Submissions Being Processed for Author Anna Luiza Bauer Canellas

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Authorship	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ENVPOL-D-20-01634	Understanding the occurrence and trend of antimicrobial-resistant <i>Vibrio</i> spp. in an urban tropical estuary	Other Author	Sep 10, 2020	Nov 01, 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu