

BEATRIZ DE CARVALHO RIBEIRO

**ENZIMAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS
ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS *Oscarella* (Porifera, Homoscleromorpha)**



**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/2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

d484e de Carvalho Ribeiro, Beatriz
ENZIMAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS
ESPONJAS Oscarella (Porifera, Homoscleromorpha) /
Beatriz de Carvalho Ribeiro. -- Rio de Janeiro,
2023.
84 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, 2023.

1. bactérias associadas às esponjas. 2. enzimas.
3. Oscarella. 4. potencial biotecnológico. I. Silva
Laport, Marinella, orient. II. Rodrigues de
Oliveira, Bruno Francesco, 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(A): **Beatriz de Carvalho Ribeiro**

DRE: 119019669

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
 Dr. Athayde Neves Junior
 Dra. Anaira Lage de Santa Luzia de Jesus
 Prof. Dr. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Título da Monografia: "Enzimas produzidas por bactérias associadas às esponjas *Oscarella* (Porifera, Homoscleromorpha)"

Local: Sala de seminários do DMM do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 08 de dezembro de 2023 às 09:00h

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 40 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 8 de dezembro de 2023.

NOTA:

Banca Examinadora:

50

Ana Maria M de Almeida

Profa. Dra. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)

40

Athayde Neves Junior

Dr. Athayde Neves Junior

40

Anaira Lage de Santa Luzia de Jesus

Dra. Anaira Lage de Santa Luzia de Jesus

Prof. Dr. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Beatriz de Carvalho Ribeiro

Beatriz de Carvalho Ribeiro

Aluno(a):

Orientador(a)
(e coorientador):

Marinella da Silva Laport Bruno Francisco Rodrigues de Oliveira

Profa. Marinella Silva Laport e Prof. Bruno Francisco Rodrigues de Oliveira

Coordenadora de

Marinella da Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

TCC:

AGRADECIMENTO

A conclusão deste trabalho marca o término de uma jornada repleta de desafios e aprendizados, e é com profunda gratidão que expresso meus agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram para o sucesso deste Trabalho de Conclusão de Curso. Primeiramente, quero expressar minha eterna gratidão à minha família, em especial aos meus pais Angélica e António, e às minhas irmãs Clarisse e Carol, vocês sempre foram minha fonte de inspiração, amor e apoio incondicional. Obrigada pelo companheirismo, por estarem presentes nos momentos especiais, celebrando cada conquista. Suas palavras de encorajamento e o amor que demonstraram são incalculáveis. Apesar da distância física que nos separa, eu e minha irmã Carol, que reside na Alemanha, sinto a proximidade do seu coração a cada etapa da minha jornada. Obrigada, minha irmã Clarisse, que está sempre ao meu lado, oferecendo conselhos e abraços sempre que preciso. Agradeço por serem a base sólida da minha vida. Espero, com todo o meu coração, poder retribuir tanta dedicação e carinho no futuro.

Ao meu namorado Lucas, cuja presença é um verdadeiro presente na minha vida. Ele não apenas compartilha os momentos de celebração e alegria comigo, mas também está ao meu lado nos momentos de desafio, tornando-os mais suportáveis e me ajudando a superá-los. Sua ajuda e apoio constantes têm sido pilares de força para mim. A maneira como sempre está lá para me ouvir, aconselhar e apoiar é algo que valorizo profundamente. Lucas é uma fonte constante de amor, compreensão e carinho, e sou infinitamente grata por tê-lo ao meu lado. Nossa jornada junto é repleta de momentos especiais, e estou ansiosa para compartilhar muitos mais ao seu lado.

Às minhas amigas da escola, Amanda, Beatriz Varella, Lara, Maira e Paula. Vocês acompanharam essa jornada desde o início, estiveram presentes em cada capítulo dessa caminhada. Agradeço por cada risada compartilhada, por cada conselho valioso, por cada abraço reconfortante e por todos aqueles momentos de descontração que vivemos juntas. Valorizo imensamente esta amizade que cultivamos, ao longo desses anos, e sei que essa conexão continuará a crescer e prosperar ao longo dos anos. Cada uma de vocês desempenhou um papel fundamental na minha história e no meu crescimento pessoal, e por isso, serei eternamente grata.

Quero dedicar um momento especial de gratidão às amizades incríveis que tive o privilégio de fazer ao longo desses anos. Em particular, gostaria de expressar minha profunda admiração pela minha monitora de TC favorita, Úrsula. Ela não apenas desempenhou um papel

crucial como minha guia nessa jornada acadêmica, mas também se transformou em uma grande amiga, alguém que desejo levar para toda a vida. Além disso, quero agradecer àquela que foi a melhor companhia no laboratório, Isabelle. Ela esteve presente em cada momento desafiador, sempre oferecendo seu apoio, conhecimento e, claro, momentos divertidos que tornaram nossa jornada ainda mais especial. Ter a sorte de conhecer vocês e compartilhar não apenas essa graduação, mas também o privilégio de morarmos no mesmo bairro, foi como ganhar na loteria da vida. Às meninas do “Grupo Secreto”: Isabela, Jacqueline, Raquel e Vitória, obrigada por cada momento inesquecível que compartilhamos ao longo desta graduação e pela parceria incrível que construímos.

Gostaria de agradecer especialmente a três pessoas incríveis: Carol, Lídia e Nathália. Carol, com suas histórias tão incríveis que parecem ter saído de um filme, Lídia, que possui um senso de humor espontâneo capaz de arrancar sorrisos bobos sempre que nos encontramos, e Nathália, que desempenha o papel de "mãezona" do grupo, sempre cuidando e lutando por suas "filhas". Cada uma de vocês traz algo único e especial para a nossa amizade. Não importa o quão longe uma mora da outra, mesmo sendo cada uma em uma ponta do Rio de Janeiro, sempre encontramos um jeito de nos reunirmos fora da faculdade, criando memórias preciosas juntas. Obrigada por cada conversa em momentos de surto, por cada apoio em momentos de desespero, mas também por cada comemoração em momentos de alegria. Obrigada por tudo.

Aos membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha, obrigada por suas valiosas contribuições ao longo da minha jornada na Iniciação Científica. Obrigada por compartilharem seu conhecimento e apoio. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Microbiologia, estendo meus agradecimentos pela oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal que me proporcionaram. Quero reconhecer o comprometimento do corpo docente e administrativo, que sempre esteve à disposição para prestar assistência quando necessário. Gostaria de destacar a dedicação e carisma de todos os professores do Instituto. Suas aulas e orientações reforçaram minha convicção de que escolhi o curso de graduação certo. O compromisso de vocês com o ensino e o apoio aos alunos têm um impacto duradouro e significativo.

Ao meu coorientador Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira e à minha orientadora Marinella Silva Laport, quero dedicar minha mais profunda gratidão pela oportunidade que me proporcionaram, pela orientação exemplar, pela paciência e pelo apoio que foram fundamentais na elaboração deste trabalho e em todas as atividades desenvolvidas ao longo da iniciação científica. Expresso também meu reconhecimento pela compreensão demonstrada em todos os

desafios que enfrentamos durante este percurso, bem como pelo compartilhamento dos valiosos conhecimentos que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Suas contribuições foram verdadeiramente inestimáveis, e sou eternamente grata por tê-los como orientadores.

Também desejo estender meus agradecimentos aos órgãos de fomento, FAPERJ, CNPq, CAPES e PIBIC, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste estudo.

Por fim, quero expressar minha gratidão a cada pessoa que cruzou essa minha trajetória. Este trabalho é dedicado a todos vocês, e é resultado da soma dos esforços e apoio de cada um. Muito obrigado por fazerem parte desta conquista.

RESUMO

BEATRIZ DE CARVALHO RIBEIRO

ENZIMAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS *Oscarella*
(Porifera, Homoscleromorpha)

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Silva Laport

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

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.

As enzimas produzidas pelos microrganismos associados às esponjas constituem uma fonte promissora de biocatalisadores de relevância industrial, provavelmente devido às suas características adaptativas comuns ao ambiente marinho, como resistência a variações de salinidade, temperatura e pH. Considerando a potencial aplicação das enzimas desses simbiontes microbianos em diversas indústrias, como a de biocombustíveis, detergentes e farmacêutica, o microbioma de esponjas pode se revelar em um profícuo reservatório de biocatalisadores inéditos. O presente estudo focou em rastrear a produção de enzimas por bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* coletadas em diferentes locais: Cabo Frio (RJ), cavernas submarinas de Marselha (França) e do Arquipélago de Fernando de Noronha (RJ). As bactérias isoladas das esponjas em Cabo Frio ($n = 43$) e Marselha ($n = 27$) já faziam parte da coleção de bactérias do laboratório e foram reativadas em meio BHI para as próximas etapas experimentais. Por sua vez, o isolamento bacteriano das esponjas coletadas em Fernando de Noronha foi conduzido no presente trabalho. Os extratos das onze amostras de esponjas coletadas em Fernando de Noronha foram diluídos (10^{-3} a 10^{-5}) e semeados em seis meios de cultura: BHI, BHI 1:10, Marine, Marine 1:10, Meio Mineral Mínimo adicionado de ágar e de alginato de sódio. Todas as bactérias isoladas foram armazenadas no mesmo meio de isolamento adicionado de 20% de glicerol (v/v). As bactérias foram mantidas na bacterioteca do laboratório a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente foram identificadas por MALDI-TOF MS. Todas 314 estirpes foram testadas quanto à produção de diversas enzimas através de meios adicionados de 1,5% de ágar e substratos específicos: LB contendo amido (amilase); carboximetilcelulose (CMC, holocelulase); Sierra acrescido de Tween 80 (lipase) ou de Tween 20 (esterase); Leite Desnatado (peptidase), Mineral Mínimo e Hu (agarase), Mineral Mínimo suplementado de alginato de sódio e Nakamura (alginato-liase). A análise da produção enzimática foi feita através da observação de halos das zonas de degradação dos substratos. O cálculo do Índice Enzimático (IE) foi realizado através da razão entre o diâmetro de hidrólise e o diâmetro do crescimento bacteriano em milímetros (mm), sendo considerada potencial produtora da enzima àquela estirpe que na presença de determinado substrato apresentou um $\text{IE} \geq 2,0$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Das 43 bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* em Cabo Frio, 11,6% foram potenciais produtoras de lipase, 16,2% de agarase e 25,5% de alginato-liase. Das 27 bactérias isoladas de *Oscarella* de Marselha, 7,4% com $\text{IE} \geq 2$ para celulase, 18,5% para lipase, 3,7% para agarase e 66,6% alginato-liase. Das 244 bactérias isoladas de *Oscarella* de Fernando de Noronha, foram detectadas 13,5% para amilase, 48,7%

para celulase, 9% lipase, 8,1% esterase, 3,6% peptidase, 55,7% agarase e 12,7% alginato-liase. A diversidade enzimática detectada nas bactérias isoladas das esponjas evidencia a importância de estudos sobre as potencialidades biotecnológicas desse microbioma.

Palavras-chave: bactérias associadas às esponjas, enzimas, *Oscarella*, potencial biotecnológico.

ABSTRACT**BEATRIZ DE CARVALHO RIBEIRO****ENZYMES PRODUCED BY BACTERIA ASSOCIATED WITH *Oscarella* SPONGES (Porifera, Homoscleromorpha).**

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Silva Laport

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

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 enzymes produced by sponge-associated microorganisms constitute a promising source of industrially-relevant biocatalysts, likely due to their adaptive characteristics inherent to the marine environment, such as resistance to salinity fluctuations, temperature and pH. Considering the potential application of enzymes from these microbial symbionts in various industries, such as biofuels, detergents and pharmaceuticals, the sponge microbiome could prove to be a fruitful reservoir of novel biocatalysts. The present study focused on screening the production of enzymes by bacteria isolated from *Oscarella* sponges sampled in different locations: Cabo Frio (RJ), underwater caves in Marseille (France) and the Fernando de Noronha Archipelago (RJ). The bacteria isolated from sponges in Cabo Frio (n = 43) and Marseille (n = 27) were already part of the laboratory culture collection and were reactivated in BHI medium for the next experimental steps. On the other hand, bacterial isolation from sponges collected in Fernando de Noronha was performed in the present work. The extracts from the eleven sponge samples collected in Fernando de Noronha were diluted (10⁻³ to 10⁻⁵) and inoculated in six culture media: BHI, BHI 1:10, Marine, Marine 1:10, Minimum Mineral Medium added with agar and sodium alginate. All isolated bacteria were stored in the same isolation medium added with 20% glycerol (v/v). The bacteria were maintained in the laboratory culture collection at -20 °C and were subsequently identified by MALDI-TOF MS. All 314 strains were tested for the production of various enzymes using media added with 1.5% agar and specific substrates: LB containing starch (amylase); carboxymethylcellulose (CMC, holocellulase); Sierra supplemented with Tween 80 (lipase) or Tween 20 (esterase); Skimmed Milk (peptidase), Minimum Mineral and Hu (agarase), Minimum Mineral supplemented with sodium alginate and Nakamura (alginate-lyase). The analysis of enzyme production was carried out by observing halos corresponding to zones of substrate degradation. The calculation of the Enzyme Index (IE) was carried out using the ratio between the hydrolysis diameter and the diameter of bacterial growth in millimeters (mm). All experiments were performed in triplicate. From 43 bacteria isolated from *Oscarella* sponges in Cabo Frio, 11.6% were potential producers of lipase, 16.2% of agarase and 25.5% of alginate-lyase. Of the 27 bacteria isolated from *Oscarella* in Marseille, 7.4% had IE ≥ 2 for holocellulase, 18.5% for lipase, 3.7% for agarase and 66.6% alginate-lyase. Of the 244 bacteria isolated from *Oscarella* de Fernando de Noronha, 13.5% were detected for amylase, 48.7% for cellulase, 9% lipase, 8.1% esterase, 3.6% peptidase, 55.7% agarase and 12.7% alginate lyase. The enzymatic diversity detected in bacteria isolated from sponges highlights the importance of studies on the biotechnological potential of this microbiome.

Keywords: sponge-associated bacteria, enzymes, *Oscarella*, biotechnological potential

RESUMO PARA LEIGOS

BEATRIZ DE CARVALHO RIBEIRO

A VIDA MICROSCÓPICA NAS ESPONJAS: UM MERGULHO NUM MUNDO DE DESCOBERTAS

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Silva Laport

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

Resumo para leigos 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.

Em um mundo onde a natureza continua a surpreender com suas maravilhas escondidas, uma equipe de pesquisadores mergulhou nos oceanos para estudar as esponjas marinhas. Esses seres vivos abrigam uma infinidade de microrganismos e essa parceria é benéfica para as duas partes. Os parceiros microbianos podem ajudar a esponja a se defender de animais competidores, como peixes e tartarugas, através da produção de substâncias de defesa e, como forma de agradecimento, a esponja oferece hospedagem e um “banquete” nutricional para seus amigos microscópicos. Essa pesquisa foi direcionada para descobrir quais substâncias ou mais especificamente, enzimas, essas bactérias, que vivem no corpo das esponjas, produzem e como elas podem ser úteis para a humanidade. Isso porque ao identificar essas enzimas, poderiam descobrir novas maneiras de melhorar produtos e processos em diversas indústrias, desde laticínios, detergentes, combustíveis, cosméticos e até a farmacêutica. Nessa jornada científica, a equipe visitou lugares tão diversos quanto as águas tropicais de Cabo Frio no Rio de Janeiro, até as cavernas submarinas de Marselha na França e de Fernando de Noronha em Pernambuco para realizar a coleta das esponjas marinhas. A descoberta foi realmente notável, muitas das bactérias que residem nas esponjas produzem enzimas com a capacidade de quebrar uma variedade de componentes, o que permite pensar nas possíveis aplicações industriais, para tornar os processos mais sustentáveis e eficazes. Além do potencial dessas descobertas, os resultados do estudo também destacam a riqueza e a importância da biodiversidade marinha. Ao entender melhor essas relações entre esponjas e bactérias no oceano, pode-se aprender mais sobre a evolução, a adaptação e as complexas redes de interações que sustentam a vida no planeta. Em resumo, o estudo mostrou o incrível potencial das bactérias associadas às esponjas e reforçou a ideia de que a natureza é uma fonte inesgotável de recursos e soluções para os desafios que a humanidade enfrenta. O mais inspirador é perceber que, ao cuidar do ambiente e explorá-lo com respeito e curiosidade, pode-se encontrar maneiras de melhorar a qualidade de vida. E quem poderia imaginar que as simples esponjas do mar esconderiam tal segredo?



ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
RESUMO PARA LEIGOS.....	xi
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Esponjas marinhas.....	15
1.2 Classe Homoscleromorpha: Gênero <i>Oscarella</i>	17
1.3 Comunidades procarióticas associadas às esponjas marinhas	19
1.4 Aplicações biotecnológicas das comunidades microbianas associadas às esponjas da Classe Homoscleromorpha: Gênero <i>Oscarella</i>	21
1.5 Enzimas microbianas	23
1.5.1 Enzimas microbianas marinhas	25
1.5.2 CAZymes	25
1.5.2.1 Amilase	26
1.5.2.2 Agarase	27
1.5.2.3 Alginato-liase.....	29
1.5.2.4 Celulase.....	31
1.5.3. Carboxilesterases	32
1.5.3.1 Lipase.....	33
1.5.3.2 Esterase	34
1.5.4 Peptidase	36
1.6 Enzimas do microbioma de esponjas	37
1.7 Esponjas do gênero <i>Oscarella</i> em Cabo Frio (RJ, Brasil) e na França.....	39
2 JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Reativação das bactérias isoladas de esponjas marinhas <i>Oscarella</i> spp. coletadas em	

2013 em Cabo Frio (Brasil) e Marselha (França).....	45
4.2 Coleta de esponjas do gênero <i>Oscarella</i> de cavernas submarinas do Arquipélago de Fernando de Noronha (PE, Brasil).....	45
4.3 Isolamento das bactérias associadas às esponjas do gênero <i>Oscarella</i> coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha.....	46
4.4 Identificação das bactérias isoladas de <i>Oscarella</i> spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha.....	47
4.5 Padronização do meio de triagem de alginato-liase.....	48
4.6 Triagem da produção de enzimas de interesse biotecnológico.....	48
4.7 Análise comparativa da atividade enzimática das bactérias de esponjas coletadas em diferentes locais.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Reativação das bactérias isoladas de esponjas marinhas <i>Oscarella</i> spp. coletadas em 2013 em Cabo Frio (Brasil) e Marselha (França).....	50
5.2 Isolamento das bactérias associadas às esponjas <i>Oscarella</i> spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha.....	50
5.3 Identificação das bactérias isoladas de esponjas <i>Oscarella</i> spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha.....	51
5.4 Triagem da produção de enzimas de interesse biotecnológico.....	53
5.5 Bactérias com potencial capacidade multienzimática.....	57
5.6 Análise comparativa da atividade enzimática das bactérias de esponjas <i>Oscarella</i> spp. coletadas em diferentes locais.....	59
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73
9 ANEXOS	81
AGARASE.....	81
ALGINATO-LIASE	82
AMILASE.....	83
CELULASE	83
LIPASE/ESTERASE	84
PEPTIDASE	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas marinhas

As esponjas marinhas (filo Porifera) representam os mais antigos metazoários multicelulares na face da Terra (Turner, 2021). Esses seres estão evoluindo há mais de 600 milhões de anos e atualmente são descritas cerca de 9.609 espécies (de Voogd *et al.*, 2023). São animais sésseis e filtradores com capacidade de filtrar até 24.000 litros de água por quilograma de sua biomassa por dia (Vogel, 1977). Apresentam diversidade de formas e cores, podendo alterá-las de acordo com o substrato e o ambiente que habitam, e, muitas vezes, as cores das esponjas derivam das associações com microrganismos (Fransozo e Negreiros-Fransozo, 2017).

Taxonomicamente, o filo Porifera é dividido em quatro classes principais: Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida e Homoscleromorpha (Gazave *et al.*, 2012). Esponjas da classe Demospongiae se destacam pela sua diversidade, constituindo aproximadamente 92% de todas as espécies, segundo o World Porifera Database (de Voogd *et al.*, 2023). A classe Homoscleromorpha é a mais recente na taxonomia do filo, sendo anteriormente considerada uma ordem da classe Demospongiae. Após análises filogenéticas com diferentes marcadores moleculares, sucedeu-se uma revisão taxonômica, que elevou essa ordem a nível de classe Homoscleromorpha no filo Porifera. Atualmente, a classe Homoscleromorpha possui 136 espécies aceitas, representando o menor número de espécies aceitas em relação a outras classes de poríferos (de Voogd *et al.*, 2023).

As esponjas podem ser encontradas em sistemas marinhos e de água doce e em regiões tropicais, temperadas e polares (Hooper e Van Soest, 2002), desde regiões mais rasas até locais mais profundos, com condições variadas de temperatura, salinidade e luminosidade (Diaz, Smith e Rützler, 2004, Van Soest *et al.*, 2012). Estes animais não possuem órgãos, células sensoriais ou nervosas, logo, toda a sua fisiologia depende de células com funções específicas. Apresentam uma matriz extracelular chamada de mesoólo, uma região interconectiva rico em colágeno, onde estão presentes células ameboides, espículas e bactérias simbiotes. Os pinacócitos são células de revestimento, que formam o pinacoderme capaz de isolar a esponja do meio externo. Em algumas espécies de Demospongiae e em todas as Homoscleromorpha, os pinacócitos são flagelados. Os porócitos são responsáveis pela entrada de água no sistema aquífero, enquanto os coanócitos são responsáveis pelo fluxo de água, captura de alimentos e trocas gasosas. Dessa maneira, a água entra através de pequenos poros com diâmetro medindo de 10 a 100 μm localizados na superfície da esponja, percorre unidirecionalmente um sistema

de canais e câmaras coanocitárias e deságua em uma cavidade chamada átrio para ser liberada pelo ósculo, uma abertura maior situada na região superior da esponja (Klautau, M., 2016). Quando a água entra em contato com os coanócitos, partículas alimentares de diferentes tamanhos são capturadas, como macromoléculas, vírus, bactérias, cianobactérias e leveduras (Maldonado et al., 2010). O coanócito digere as partículas e transferem-as para os arqueócitos no mesoílo. Esses arqueócitos distribuem essas partículas excedentes para os demais tipos celulares. Com isso, a digestão nas esponjas ocorre nos vacúolos com atuação de enzimas digestivas (Klautau, 2016) (Figura 1).

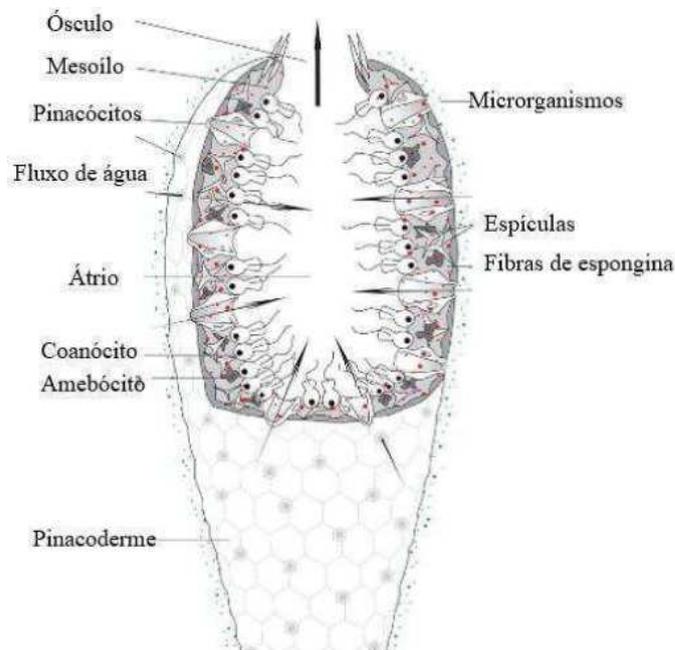


Figura 1: Anatomia de uma esponja marinha adulta sinalizando a abertura maior, pela qual a água é expelida após ter circulado o fluxo de água pela esponjas (ósculo) com auxílio dos coanocitos (células flageladas que movimentam a água), a matriz extracelular (mesoílo), onde estão situados os amebócitos, espículas e microrganismos simbiotes, os pinacócitos que revestem a esponja, formando uma camada chamada pinacoderme, que protege a esponja do ambiente externo, essas estruturas são sustentadas pela proteína de colágeno (esponjina). (Adaptada de Webster e Thomas, 2016).

Os poríferos podem apresentar ou não algum tipo de esqueleto. Geralmente, possuem um esqueleto, que pode ser orgânico ou mineral. Nas esponjas que não possuem um esqueleto, como algumas espécies de Demospongiae e de Homoscleromorpha, a sustentação do corpo é proporcionada pelo colágeno presente no mesoílo (Klautau, M., 2016). Por outro lado, no caso do esqueleto orgânico, o colágeno (esponjina) (Figura 1) é produzido na forma de fibras que se entrelaçam, formando uma rede tridimensional que confere maciez e resistência ao corpo do animal. Já o esqueleto mineral pode ser maciço ou composto por espículas dispersas pelo corpo da esponja, podendo ser unidas por esponjina. As espículas são estruturas microscópicas

compostas por carbonato de cálcio ou sílica. Existem diversas combinações de esqueleto, como somente espículas de carbonato de cálcio (classe Calcarea), somente espículas de sílica (classes Demospongiae, Hexactinellida e Homoscleromorpha), fibras de esponjina (classe Demospongiae), espículas de sílica combinadas com esponjina (classe Demospongiae), esqueleto maciço de carbonato de cálcio mais espículas de carbonato de cálcio (esponjas coralinas da classe Calcarea), e esqueleto maciço de carbonato de cálcio junto com espículas de sílica (esponjas coralinas da classe Demospongiae) (Klautau, M., 2016).

As esponjas desempenham um papel crucial nos ecossistemas bentônicos, ocupando cerca de 80% do substrato disponível e fornecendo habitat para uma vasta gama de espécies marinhas. Além disso, as esponjas conectam as zonas bentônicas e pelágicas através da filtração de grandes volumes de água do mar, mediam processos biogeoquímicos que contribuem para o consumo e liberação de nutrientes, como nitrato, nitrito, amônio e fosfato. Ademais, as esponjas marinhas são importantes no processo de metabolização primária através de simbioses microbianos; na reciclagem do carbono orgânico, a qual libera nutrientes consumidos por detritívoros. Portanto, a preservação e proteção desses animais é fundamental para a conservação de ecossistemas marinhos e sua biodiversidade (Bell *et al.*, 2008).

1.2 Classe Homoscleromorpha: Gênero *Oscarella*

Representando aproximadamente 1,4% da diversidade do filo Porifera (de Voogd *et al.* 2023), a classe Homoscleromorpha, é constituída por duas famílias, Plakinidae e Oscarellidae, e nove gêneros, dentre esses, destaca-se o gênero *Oscarella*, que apresenta algumas características únicas em relação a esponjas das outras classes (Gazave *et al.*, 2013; Renard *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2018). Esponjas pertencentes à classe Homoscleromorpha se distinguem das demais, principalmente, pela existência de uma membrana basal (Boute *et al.*, 1996; Ereskovsky, *et al.*, 2009; Gazave *et al.*, 2012). Além disso, algumas espécies apresentam ausência de esqueleto e, quando presente, as espículas possuem quatro eixos (tetratractinas) (Renard *et al.*, 2013). Uma característica ecológica comum dessas esponjas é a preferência por áreas sombreadas ou com pouca luz, como a parte inferior de habitats rochosos ou em cavernas submarinas semi-escuras ou escuras, porém também são frequentemente encontradas em águas rasas (mas sempre em áreas sombreadas) (Boury-Esnault *et al.*, 2013; Ruiz *et al.* 2020). As cavernas são habitats conhecidos por sua biodiversidade única, onde as esponjas representam o táxon dominante, em termos de diversidade de espécie e biomassa (Gerovasileiou e Voultsiadou, 2012).

Esponjas do gênero *Oscarella* são caracterizadas por uma anatomia considerada simples e com ausência de espículas minerais, a qual é uma característica responsável pela diferenciação de gêneros (Gazave *et al.*, 2012). Além disso, podem apresentar diversas cores, como, amarelo, violeta, verde, vermelho ou azul e essas espécies possuem diferentes consistências, algumas podem possuir anatomia semi-cartilaginosa e outras são moles (Figura 2) (Boury-Esnault *et al.*, 2013). *Oscarella* spp. podem ser encontradas em diversos habitats marinhos, desde zonas intertidais até áreas mais profundas, com distribuição geográfica que abrange o Mar Mediterrâneo e os Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Boury-Esnault *et al.*, 2013 e Renard *et al.*, 2021). Atualmente, segundo o banco de dados *World Porifera Database*, o gênero *Oscarella* é composto por 26 espécies aceitas (de Voogd, *et al.*, 2023). No entanto, vale ressaltar que a taxonomia de esponjas está em constante atualização, sendo assim, conforme surgem novos estudos, novas espécies podem ser descobertas, enquanto outras podem ser adicionadas ou excluídas do gênero *Oscarella* (Boury-Esnault *et al.*, 2013).



Figura 2: *Oscarella* spp., um dos espécimes de esponjas marinhas coletada na Gruta da Ilha do Meio, Arquipélago de Fernando de Noronha – PE, Brasil em nov/2022. Amostra faz parte da coleção de Porifera do Museu Nacional do Rio de Janeiro e está tombada sob o código MNRJ 29329 (Foto cedida pelo Prof. Dr. Guilherme Muricy, MN-UFRJ).

As esponjas do gênero *Oscarella* têm sido objeto de estudo em biologia marinha e evolução devido à sua simplicidade estrutural e genômica (Ereskovsky *et al.*, 2009). A presença de tecidos epiteliais é uma característica fundamental de todos os Metazoa, sendo o primeiro sinal visível de diferenciação celular e a construção dos corpos de animais durante o

desenvolvimento. A aquisição do epitélio representa uma inovação evolutiva crucial na origem do estabelecimento da multicelularidade. No entanto, essa organização típica do epitélio, geralmente, não está presente em linhagens não bilaterianas, com exceção das Cnidaria. Dentre as quatro classes distintas do filo Porifera, apenas as esponjas Homoscleromorpha, como espécie de *Oscarella*, possuem tecidos que se assemelham aos epitélios bilaterianos. Portanto, essas esponjas são consideradas valiosas para estudo da evolução e do desenvolvimento de tecidos epiteliais (Vernale *et al.*, 2021).

Algumas espécies de *Oscarella* são capazes de se regenerar completamente a partir de pequenos fragmentos. Nesse sentido, esse fenômeno regulatório é considerado importante devido ao seu potencial biotecnológico. A regeneração envolve o reconhecimento da perda ou lesão de tecidos, seguido por mecanismos que restauram a estrutura danificada. Dessa maneira, esse processo oferece grandes promessas não apenas para a compreensão de questões específicas de desenvolvimento de espécies, mas também para aplicações médicas (Ereskovsky *et al.*, 2015). Além disso, as esponjas *Oscarella* também têm sido alvo de pesquisa na biotecnologia em razão das interações hospedeiro-microbioma que possuem capacidades únicas de produzir biomoléculas interessantes para essa área (Laport *et al.*, 2017, Nunes *et al.*, 2021; Canellas *et al.*, 2023).

1.3 Comunidades procarióticas associadas às esponjas marinhas

A relação entre microrganismos e esponjas marinhas é uma das interações simbióticas mais antigas e evolutivamente conservadas no reino animal, com evidências fósseis que datam pelo menos 635 milhões de anos (Li *et al.*, 2018). Estudos genômicos e moleculares têm fornecido melhor compreensão dessas relações, revelando que a maioria do repertório genético no genoma do holobionte é fornecido pelos microrganismos associados. Com isso, sugere-se que seja parcialmente hereditário, com eventos tanto de transferência horizontal quanto vertical do genoma ao longo da evolução (de Oliveira *et al.*, 2020). Análises filogenéticas de comunidades microbianas associadas à esponjas mostram uma conservação significativa de clados bacterianos em diferentes espécies de esponjas e regiões geográficas, indicando uma coevolução de longa data entre esponjas e seus simbiontes procarióticos (Schmitt *et al.*, 2012; Moitinho-Silva *et al.*, 2017).

Apesar de seu plano corporal simplista, que coloca as células em contato direto com a água do mar circundante, as esponjas são conhecidas por hospedar diversas comunidades microbianas, que podem representar até 38% da biomassa do hospedeiro (Vacelet, 1975). Os microrganismos estabelecem relações simbióticas com as esponjas, contribuindo para a

nutrição, defesa, imunidade e desenvolvimento do hospedeiro (Pita *et al.* 2018). Isso porque esses microrganismos simbiotes realizam várias funções como fotossíntese, oxidação de metano, fixação de nitrogênio, nitrificação, desalogenação e redução de sulfato. A fotossíntese realizada por cianobactérias, diatomáceas e algas unicelulares auxilia no ciclo do carbono das esponjas, com esses microrganismos utilizando os resíduos de carbono, nitrogênio e fósforo excretados pelas esponjas para produzir glicerol ou glicose, que são usados como fonte de energia pelas esponjas marinhas. Os microrganismos simbiotes são uma fonte importante de nitrogênio para as esponjas, pois podem fixar nitrogênio atmosférico e converter a amônia excretada pelas esponjas em nitrito e nitrato. Os poríferos também metabolizam enxofre, e algumas bactérias obtêm energia da oxidação de enxofre. A relação simbiótica entre esponjas e microrganismos é crucial para a saúde das esponjas, pois desequilíbrios na microbiota bacteriana podem levar a doenças e morte. A produção de diversos metabólitos secundários pelas comunidades microbianas associadas às esponjas constitui a defesa química contra patógenos e predadores (Taylor *et al.*, 2007; Fransozo e Negreiros- Fransozo, 2017; Pita *et al.* 2018; Webster e Thomas, 2016).

Dessa forma, as esponjas são descritas como “holobiontes”, termo que se refere a um metaorganismo que é composto do hospedeiro eucariótico multicelular e seu microbioma associado (Rosenberg e Zilber-Rosenberg, 2018). Esse microbioma é essencial para a sobrevivência e crescimento das esponjas. Além disso, a composição e diversidade dessas comunidades microbianas podem variar entre as diferentes espécies de esponjas, sendo dividida 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).

As esponjas do grupo LMA possuem concentrações de microrganismos associados que se assemelham às encontradas na água do mar circundante. Por outro lado, as esponjas HMA contêm uma quantidade microbiana que supera em duas ou três ordens de magnitude a encontrada na água do mar, e apresentam uma diversidade microbiológica superior em comparação com as esponjas LMA (Hentschel *et al.*, 2006). Estudos indicam que essa distinção entre as esponjas HMA e LMA pode estar relacionada a diferenças morfológicas. O grupo HMA contêm o mesoílo mais denso e sistemas aquíferos complexos, com canais de água estreitos e longos, com isso há menor taxa de filtração da água do mar (Hentschel *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007), conforme evidenciado por experimentos e microscopia eletrônica de transmissão (Weisz *et al.*, 2008; Gloeckner *et al.*, 2014). Com o avanço dos estudos na caracterização de

mais espécimes, tem-se visto que os microbiomas das esponjas HMA são extremamente ricos e complexos e é caracterizado pela presença de filos indicadores como Cloroflexi e Poribacteria (Gloeckner *et al.*, 2013), enquanto a comunidade microbiana de LMA é restrito à Proteobacteria e Cyanobacteria (Moitinho-Silva *et al.*, 2017).

Há um crescente interesse nos microrganismos associados às esponjas, por serem considerados uma fonte promissora de produção diversa de metabólitos bioativos com uma variedade de potencialidades biotecnológicas, como substâncias antimicrobianas, enzimas, biosurfactantes e bioemulsificantes (Santos-Gandelman *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2020; Freitas-Silva *et al.*, 2022). A pesquisa por metabólitos secundários da microbiota de esponjas ainda é incipiente, logo, existem altas chances de encontrar novos compostos bioativos capazes de inibir bactérias de importância clínica (Laport, Santos e Muricy, 2009; Santos-Gandelman *et al.*, 2014). As esponjas se destacam como um dos organismos marinhos que mais produzem metabólitos exclusivos, tendo sido relatados mais de 3.500 compostos novos originados de esponjas no período entre 1985 e 2008 (Anteneh *et al.*, 2022). Nesse contexto, as esponjas marinhas e seus simbiontes procarióticos constituem um sistema modelo relevante para o estudo das interações hospedeiro-microrganismo e para a exploração de novas fontes de compostos bioativos com potencial aplicação biomédica e biotecnológica (de Oliveira *et al.*, 2020).

1.4 Aplicações biotecnológicas das comunidades microbianas associadas às esponjas da Classe Homoscleromorpha: Gênero *Oscarella*

Poucos estudos têm explorado a diversidade e a função da comunidade procariótica associada a esponjas *Oscarella*, o que representa uma lacuna de conhecimento significativa que precisa ser preenchida. O conhecimento sobre a abundância microbiana em Homoscleromorpha tem sido analisado primariamente por meio de microscopia eletrônica. Essa metodologia fornece informações acerca da morfologia, localização e abundância microbiana (Freitas-Silva *et al.*, 2020). Enquanto a metagenômica tem capacidade de avaliar a diversidade microbiana e sugerir possíveis funções fisiológicas das bactérias associadas (Vishnyakov e Ereskovsky, 2009; Boury-Esnault *et al.*, 2013; Gloeckner *et al.*, 2014).

Um estudo de Laport e colaboradores (2017), teve como objetivo analisar a comunidade bacteriana cultivável de esponjas *Oscarella*, coletadas em Cabo Frio, Brasil e avaliar o potencial antimicrobiano. Foi realizado sequenciamento do gene *rrs* para identificar filogeneticamente 337 unidades formadoras de colônia isoladas de *Oscarella*. Como resultados, a comunidade bacteriana era majoritariamente Pseudomonadota e Bacillota, sendo que o gênero mais abundante foi *Vibrio*, seguido por *Shewanella*. Ao serem analisadas para a produção de

antimicrobianos, verificou-se que as bactérias dos 12 gêneros isolados de *Oscarella* sp. foram capazes de produzir essas substâncias. A maioria das estirpes tiveram interações antagônicas contra bactérias de importância clínica. Os resultados obtidos sugerem que o antagonismo químico desempenha um papel fundamental na formação das comunidades bacterianas associadas à *Oscarella*. Portanto, essas estirpes representam fontes interessantes para descoberta de novas substâncias antimicrobianas, as quais podem ser úteis para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Esta pesquisa, pioneira e inovadora na análise da diversidade e na avaliação da atividade antagônica das bactérias isoladas de *Oscarella* sp., enfatiza o potencial biotecnológico dessas estirpes para síntese de novos antimicrobianos (Laport *et al.*, 2017).

Considerando o desafio de tratar infecções causadas por biofilmes, responsáveis por aproximadamente 75% das infecções humanas, devido à resistência aos antimicrobianos existentes, torna-se urgente a busca por novas substâncias antibiofilme (Canellas *et al.*, 2023). Com isso, um estudo com bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* revelou que a estirpe *Enterobacter* 84.3 produz moléculas bioativas com a capacidade de inibir e desagregar biofilmes formados por *Staphylococcus* spp. Através de análises de microscopia confocal foi possível observar que o extrato bioativo reduziu significativamente a camada de biofilme de *S. aureus* e reduziu as interações entre as células. Vale ressaltar que este extrato bioativo não apresentou citotoxicidade em células de mamíferos (Nunes *et al.*, 2021). O estudo seguinte realizado por Canellas e colaboradores (2023), confirmou, através da microscopia eletrônica de varredura, que 32 µg/mL do extrato aquoso da estirpe *Enterobacter* 84.3, tinha a capacidade de inibir e desassociar o biofilme maduro de *S. aureus* em 85,3%. Ademais, foi investigado a natureza química dos componentes ativos desse extrato aquoso e o potencial do mecanismo de ação dessas moléculas antibiofilme em células de estafilococos. A identificação, por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução" (do inglês "*High-Performance Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometry*" - LC-HRMS), revelou sete moléculas promissoras na atividade antibiofilme do extrato aquoso, incluindo alcaloides, macrolídeos, esteroides e triterpenos, sugerindo uma ação sinérgica. Portanto, esses resultados obtidos realçam o potencial da estirpe *Enterobacter* 84.3, isolada de esponja do gênero *Oscarella*, como uma fonte interessante de moléculas para o tratamento e/ou prevenção de infecções por *S. aureus* formadores de biofilmes (Nunes *et al.*, 2021; Canellas *et al.*, 2023).

Com o objetivo de obter uma visão mais abrangente da diversidade bacteriana associada

à classe Homoscleromorpha, Glöeckner e colaboradores (2013) utilizaram técnicas de construção de bibliotecas genômicas e sequenciamento do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico, para analisar a diversidade microbiana associada a cinco espécies diferentes do gênero *Oscarella*. Nesse estudo, foram identificados quatro filos: Actinobacteria, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes e Pseudomonadota. Na espécie de esponja *Oscarella lobularis*, 76% das sequências pertenciam ao filo Pseudomonadota (Glöeckner *et al.*, 2013). No estudo conduzido por Glöeckner e colaboradores (2014), utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de fluorescência, a esponja *O. lobularis* foi classificada como de "baixa abundância microbiana" (LMA), devido à pouca quantidade e diversidade de microrganismos (Pita *et al.*, 2018)

Apesar da presença de exoenzimas hidrolíticas e biossurfactantes ter sido relatada no microbioma de esponjas, o conhecimento ainda é limitado sobre esses metabólitos produzidos pelos microrganismos associados às esponjas de Homoscleromorpha (de Oliveira *et al.*, 2022). Neste estudo, foi analisada a produção de hidrolases e biossurfactantes pelas bactérias isoladas de três espécies de Homoscleromorpha de águas rasas: *Oscarella* sp., *Plakina cyanorosea* e *Plakina cabofriense*. De um total de 107 estirpes isoladas, 99 apresentaram atividade para pelo menos uma das hidrolases testadas. Na investigação da produção de lipase e peptidases, nos meios Luria-Bertani (LB) e Caldo Tripton Soja (TSB), duas bactérias, do gênero *Bacillus* e isoladas de *Oscarella*, apresentaram atividade elevada das duas enzimas testadas. Além disso, a estirpe identificada como *Bacillus* sp. 80BH11 foi capaz de produzir biossurfactantes com alta potencial de emulsificação e notavelmente estáveis no meio LB. Desse modo, essa pesquisa pretende proporcionar um ponto inicial para investigação futura de enzimas e biossurfactantes, com aplicações biotecnológicas, produzidas pelo microbioma das esponjas Homoscleromorpha.

1.5 Enzimas microbianas

As enzimas agem como catalisadores de reações químicas, exibindo um alto grau de especificidade para os substratos com os quais interagem e conduzindo todas as reações fisiológicas indispensáveis à vida. Todas as enzimas são compostas por proteínas, com a exceção de um grupo de moléculas catalíticas de RNA, as ribozimas. Atualmente, esses biocatalisadores são divididos em sete classes pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês, “*The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*”): oxidorreduases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5), ligases (classe 6) e

translocases (classe 7) (Brahmachari, 2016; Tipton *et al.*, 2019).

A humanidade vem explorando esses catalisadores biológicos, desde o período pré-histórico, em uma variedade de processos, como na clarificação, filtragem e produção de vinhos e cervejas, na fabricação de pães e na fermentação do açúcar em álcool pela levedura, prática já observada no Egito Antigo para conservação de alimentos e bebidas (Cornish-Bowden, 2011). Um exemplo de uso de enzima datada no século XVIII é a tenderização de carne, o qual pesquisas sobre a digestão gástrica da carne forneceram uma base para estudos futuros sobre a catálise enzimática, sendo esta substância ativa nomeada como pepsina em 1836. A conversão do amido em açúcar foi descrita no início do século XIX, com a identificação de uma amilase vegetal. Foi reconhecido que esse processo, que ocorre durante a germinação dos grãos, se assemelha à hidrólise química, descrita em 1815 (Punekar, 2018).

O uso industrial de enzimas microbianas está ganhando mais atenção, devido às diversas vantagens sobre as enzimas vegetais e animais, como a maior estabilidade, produção em larga escala em menor tempo e maior economia. Além disso, são conhecidas pela fácil manipulação genética, não toxicidade e biodegradabilidade (Bhatt, 2022). As enzimas de origem microbiana são aplicadas em áreas da indústria como celulose e papel, detergentes, couro e têxteis, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, alimentos e bebidas e ração animal, por exemplo (Singh, Singh e Pandey, 2019).

A expansão do mercado global de enzimas deve-se a dois fatores principais. O primeiro é o crescimento da população global, que alguns estudos projetam em 28% de 2015 a 2030. O segundo fator é o crescimento da consciência ambiental, impulsionado por consumidores e legislações mais rigorosas, que resultam em pressão pública e política. Esta pressão intensificou a demanda de processos industriais a partir de recursos naturais, levando à incorporação gradual de enzimas na indústria (Arundel e Sawaya, 2009, Ghattavi e Homaei, 2023). Dessa maneira, a procura por enzimas está constantemente crescendo em todas as áreas, impulsionada pela evolução das aplicações industriais e pelo potencial de alto rendimento desses biocatalisadores. Este cenário deve incentivar investimentos em pesquisa para o descobrimento de novos biocatalisadores (Li *et al.*, 2012; Brahmachari, 2017). Portanto, estima-se que a taxa de crescimento anual das enzimas industriais atinja cerca de 10% em 2030 (Arundel e Sawaya, 2010). O valor do mercado global de enzimas industriais é previsto para totalizar US\$ 10 bilhões até 2024, com uma taxa composta de crescimento anual de 6,8% para o período 2018-2024 (Global Markets Insights, 2023).

1.5.1 Enzimas microbianas marinhas

Com cerca de 250.000 espécies, os ecossistemas marinhos representam uma vasta biodiversidade e um reservatório natural para a aquisição de diversas enzimas com potenciais biocatalisadores com aplicações na área biomédica e biotecnológica (Rao e Kumavath, 2017; Samalens *et al.*, 2022; Ghattavi e Homaei, 2023). As condições adversas deste ambiente, com extremos de salinidade, pressão, pH, temperatura e luminosidade, ou até uma combinação destes, têm impulsionado, ao longo de milhares de anos de evolução, a adaptação dos microrganismos marinhos. Isso resultou na aquisição de capacidades metabólicas únicas que garantem a sobrevivência desses organismos, e na produção de uma ampla variedade de metabólitos bioativos (Samalens *et al.*, 2022; Ghattavi e Homaei, 2023). Dessa forma, as enzimas produzidas por microrganismos naturalmente presentes nesses habitats apresentam uma série de vantagens em relação às de origem terrestre, como diversidade bioquímica, maior atividade catalítica, e facilidade de cultivo em larga escala, o que resulta em custos reduzidos e sustentabilidade (Auta *et al.*, 2022).

Dessa maneira, o interesse na busca de recursos marinhos para encontrar enzimas aplicáveis à biotecnologia tem aumentado devido às adaptações ecofisiológicas únicas dos microrganismos marinhos (Trincone, 2011; Dionisi *et al.*, 2012; Arnosti *et al.*, 2013). Considerando que a maior parte dos processos industriais ocorre em condições extremas de pH, temperaturas e salinidade, as chamadas "extremoenzimas" tem se destacado (Huston, 2008; De Santi, 2015). Portanto, os biocatalisadores marinhos são considerados eficientes para diversas indústrias, para a produção de pigmentos, pesticidas, herbicidas, toxinas, agentes antiparasitários, compostos antitumorais, antibióticos, atividades citotóxicas, além de promotores de crescimento para animais e plantas, por exemplo (Rao e Kumavath, 2017).

1.5.2 CAZymes

Os polissacarídeos são utilizados por uma variedade de organismos para armazenamento de energia dentro das células e como compostos estruturais para a formação da parede celular. O ecossistema marinho é rico em polissacarídeos complexos como ágar, alginato, carragenina, celulose, xilana e quitina, sendo abundantemente encontrados em plantas marinhas e em macro e microalgas, podendo chegar a compor mais de 50% do seu peso seco (Imran e Ghadi, 2019; Bäumgen, Dutschei e Bornscheuer, 2021).

As CAZymes (enzimas ativas de carboidratos) incluem 5 famílias, glicosídeo hidrolase (GHs), glicosiltransferases (GTs), polissacarídeo liases (PL), carboidrato esterases (CEs) e as com atividades auxiliares (AAs) (Gavande, Goyal e Fontes, 2023). A ampla diversidade da família das GHs destaca-se com 132 classes, segundo o banco de dados CAZy (www.cazy.org) (Bäumgen, Dutschei e Bornscheuer, 2021). As CAZymes possuem um papel fundamental na biossíntese, modificação, degradação de carboidratos e seus derivados. Esse grupo de enzimas também desempenha um papel importante em processos biotecnológicos, como produção de biocombustível a partir da degradação de biomassa rica em polissacarídeos (Contesini, Frandsen, e Damasio, 2021).

1.5.2.1 Amilase

As amilases são hidrolases que agem sobre polissacarídeos, auxiliando na quebra de moléculas de amido em açúcares mais simples. As enzimas amilolíticas são responsáveis pela catálise da hidrólise do amido, um carboidrato formado por cadeias de alfaD-glucose, em açúcares mais simples. Podem ser lineares ou ramificadas e dividem-se em α -, β - ou γ -amilases conforme a ligação que podem clivar. As α -amilases endo-específicas (EC 3.2.1.1) hidrolisam ligações α -1,4 nas cadeias de amilose/amilopectina, gerando glicose e maltose, enquanto as pululanases (EC 3.2.1.41) atuam somente em ligações α -1,6, formando maltodextrinas lineares. As exo-específicas, como amiloglicosidases ou glucoamilases (EC 3.2.1.3), exoamilases como β -amilases (EC 3.2.1.2) e maltotetra-hidrolases (EC 3.2.1.60), e a α -glucosidase (EC 3.2.1.20) desempenham funções variadas na hidrólise de cadeias e liberação de unidades de glicose. As fontes microbianas marinhas para a produção de amilases incluem *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* sp. e *Rhizopus japonicus* (Lopes *et al.*, 2023).

Atualmente, a maior parte do processamento industrial de amido por hidrólise é realizado com o uso de amilases (Raveendran *et al.*, 2018). Nas últimas três décadas, as amilases provenientes de fontes microbianas têm feito contribuições significativas para a indústria de biotecnologia, superando aquelas produzidas a partir de plantas ou animais (Auta *et al.*, 2022). Essas enzimas amilolíticas são de extrema importância em processos biotecnológicos, sendo utilizadas na produção de bebidas alcoólicas, como a cerveja, na indústria de rações animais, na composição de detergentes para roupas, na produção de alimentos, bem como nas indústrias têxtil e de papel (Karigar e Rao, 2011; Auta *et al.*, 2022). Além disso, as bactérias marinhas produzem amilases que apresentam características únicas de adaptação ao ambiente marinho,

como tolerância à salinidade e temperatura (Suriya *et al.*, 2016).

O estudo de Erfanimoghadam e Homaei (2023) teve como objetivo isolar e identificar bactérias simbióticas no intestino dos peixes *Sillago sihama* e *Rastrelliger canagorta*, que habitam a Ilha Qeshm, Iran. As bactérias intestinais simbióticas dessas espécies foram isoladas em meio de cultura nutriente ágar, e em seguida, as bactérias produtoras de amilase foram selecionadas utilizando um meio de cultura contendo amido como substrato e foi realizado o teste com solução de Lugol. Com isso, a atividade amilolítica foi indicada pela visualização de um halo ao redor da colônia e os diâmetros foram medidos. As bactérias potenciais produtoras com maior atividade enzimática foram selecionadas e identificadas através da análise da sequência do gene 16S rRNA. Como resultado, das 22 estirpes bacterianas, 10 foram capazes de crescer em um meio de cultura com amido, e 5 das 10 cepas apresentaram halos de atividade. Entre as bactérias amilolíticas, quatro cepas bacterianas foram identificadas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Duas linhagens de *B. subtilis* apresentaram alta atividade enzimática, sendo a atividade máxima observada a 60°C e valores de pH de 5 e 7, respectivamente. Portanto, a conclusão dos autores foi que as bactérias simbióticas marinhas do gênero *Bacillus* podem ser consideradas potenciais produtoras de amilase com aplicação em diversas indústrias, como de alimentos e de detergentes.

Os objetivos da pesquisa de Ginting e colegas (2021) foram isolar e identificar bactérias termofílicas produtoras de amilase em uma fonte hidrotermal localizada em Likupang, na Indonésia. Foi utilizado o meio Ágar Modificado Thermus Medium (TMMA) contendo 2% de amido com incubação a 55°C por 24-48 horas para avaliar a atividade amilolítica dessas bactérias. Após revelação com solução de lugol e identificação molecular baseada no gene codificador da região 16S rRNA, foram encontradas 12 bactérias termofílicas capazes de produzir amilase e duas bactérias foram selecionadas, pois apresentaram um índice amilolítico de 3,04-3,52 a 55°C.

1.5.2.2 Agarase

A enzima α - ou β -agarase atua primeiramente sobre a agarose oligomérica, clivando as ligações α -(1,3) ou β -(1,4), produzindo como resultado o agarotetraose ou neoagarotetraose (NA4). Estes sacarídeos, junto com outros derivados oligoméricos da agarose, são posteriormente transformados em agarobiose ou neoagarobiose (NA2) devido à ação da enzima. Na etapa seguinte, a β -agarobiose hidrolase ou a α -neoagarobiose hidrolase quebram esses compostos nas ligações β -(1,4) ou α -(1,3), formando os monômeros galactose ou anidro-L-

galactose. Estes monômeros são assimilados nas principais vias do metabolismo energético microbiano e possuem diversas bioatividades interessantes (Jahromi e Barzkar, 2018; Lopes *et al.*, 2023). Dentre as bactérias marinhas que se destacam pela capacidade de produzir agarase, podemos citar gêneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agarivorans*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Microbulbifer*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Salegentibacter*, *Thalassomonas* e *Zobellia* (Lopes *et al.*, 2023). Dessa forma, essa enzima purificada pode ser usada como para aditivos alimentares, na indústria de bebidas e alimentos, em cosméticos (Auta *et al.*, 2022). Ademais, a agarase é amplamente utilizada em laboratórios, pois, essa enzima possui a capacidade de hidrolisar a agarose, uma substância comumente usada na eletroforese para a separação de fragmentos de DNA. Dependendo do objetivo do estudo, após a eletroforese, é necessário recuperar os fragmentos de DNA que foram separados no gel de agarose. Dessa forma, essa enzima é usada para degradar a agarose e permitir a recuperação ou "eluição" dos fragmentos de DNA (Auta *et al.*, 2022).

Em um estudo, foi descoberta uma nova linhagem de *Vibrio*, denominada *Vibrio* sp. S1, isolada da água costeira da Ilha de Jeju, na Coreia, capaz de degradar ágar. Essa bactéria produziu pelo menos cinco tipos de agarases extracelulares em um meio de cultura contendo extrato de levedura e bactopectona. Duas agarases, AgaA33 e AgaA29, foram purificadas até atingirem homogeneidade e foi observado que seus pesos moleculares foram 33 kDa e 29 kDa, respectivamente, e apresentaram temperatura ótima em 45°C e pH ótimos de 7,0. Ambas as agarases são termoestáveis, mantendo 93% (AgaA33) e 87% (AgaA29) de sua atividade máxima a 50°C, e mais de 80% da atividade foi mantida após um tratamento térmico a 45°C por 1 hora. Esses resultados mostram que essas agarases são termoestáveis e possuem potencial para serem aplicadas na indústria de ágar (Chi, Seo e Hong, 2019).

Na pesquisa de Hinojosa, Asenjo e Leiva (2018), foram investigadas três macroalgas do litoral antártico (*Himantothallus grandifolius*, *Pantoneura plocamioides* e *Plocamium cartilagineum*), como possíveis fontes de bactérias catabolisadoras do ágar. Um total de 21 estirpes apresentaram atividade agarolítica no meio contendo ágar como única fonte de carbono com incubação em baixas temperaturas. A identificação pela análise das sequências do gene 16S rRNA revelou que as bactérias degradadoras de ágar pertenciam aos gêneros *Cellulophaga*, *Colwellia*, *Lacinutrix*, *Olleya*, *Paraglaciecola*, *Pseudoalteromonas* e *Winogradskyella*. Foi selecionada uma nova espécie do gênero *Olleya* para purificação da agarase, a partir do sobrenadante da estirpe, por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. O peso molecular da agarase foi estimado em 38 kDa por meio de eletroforese em

gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A enzima purificada demonstrou atividade a 4 °C, mantendo mais de 50% de sua atividade máxima nessa temperatura. Os resultados endossaram o uso potencial dessa enzima hidrolíticas ativas a baixas temperaturas na área da biotecnologia.

1.5.2.3 Alginato-liase

O alginato é um polissacarídeo em cadeia reta composto por unidades do ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) interligados. Estas unidades se organizam em três blocos distintos: ácido poli β -D-manurônico (polyM), ácido poli α -L-gulurônico (polyG) e o heteropolímero misto (polyMG). As enzimas que atuam sobre o alginato, chamadas liases, são divididas em três grupos: liases que atuam especificamente em polyM (EC 4.2.2.3), em polyG (EC 4.2.2.11) e liases de ação duplo (EC 4.2.2.-). Além disso, com base no seu mecanismo de atuação, as alginato-liases são classificadas como liases do tipo endo ou exo. As endo-liases rompem ligações internas, gerando oligossacarídeos de alginato (AOS) de diferentes tamanhos, enquanto as exo-liases degradam a partir das extremidades, resultando principalmente em monômeros e dímeros (Xue *et al.*, 2023) Essas enzimas possuem uma ampla gama de aplicações em indústrias farmacêuticas, de alimentos e na agricultura (He *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2022). O alginato é uma fonte de carbono abundante em habitats marinhos. A parede celular das algas feofíceas (Phaeophyceae) contém alginato em elevadas proporções, e devido à diversidade considerável de espécies de algas marrons, o substrato é encontrado em quantidades significativas em ambientes costeiros. Algumas espécies, como *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida*, possuem alginato que representa até 45% do seu peso seco. Além das algas marrons, certas espécies de bactérias produzem alginato como um componente essencial de biofilmes, como *Pseudomonas* (Barzkar *et. al.*, 2022).

Diferentes organismos têm sido identificados como produtores de alginato- liases, incluindo algas marinhas, moluscos marinhos, esponjas marinhas, fungos (como o *Corollospora intermedia*), leveduras (como a *Meyerozyma guilliermondii*), além de numerosas bactérias encontradas tanto em ambientes terrestres, quanto marinhos (Barzkar, *et. al.*, 2022; de Oliveira, *et al.*, 2020). No entanto, as principais produtoras de alginato-liase são as bactérias. Além disso, as alginato-liases obtidas de fontes marinhas frequentemente apresentam notável halotolerância e há uma variedade de algas que produzem quantidades significativas de alginato, que funcionam como fonte de nutrientes para as bactérias marinhas heterotróficas (Barzkar *et. al.*, 2022).

Os oligossacarídeos de alginato (AOs), gerados com degradação do alginato através da alginato-liase, também apresentam diversas propriedades biológicas que trazem benefícios para a saúde humana, como propriedades antitumorais, antidiabéticas, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas e imunomoduladoras. Geralmente, os métodos tradicionais de preparação dos AOs são realizados em condições extremas de pH ácido ou alcalino, o que resulta em impactos ambientais significativos. Em contraste, os métodos de produção dos AOs baseados em enzimas são mais sustentáveis e ecológicos (Barzkar *et. al.*, 2022).

Considera-se desafiador para os antibióticos convencionais eliminar algumas bactérias patogênicas que possuem biofilmes complexos em suas superfícies. Foi descoberto que os componentes de alginato presentes no biofilme de *P. aeruginosa* podem protegê-las do reconhecimento e eliminação pelo sistema imunológico, além de serem resistentes ao tratamento com antimicrobiano. Portanto, um possível método terapêutico para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* é a utilização de um complexo purificado de alginato-liase e antimicrobiano (Barzkar *et. al.*, 2022). No entanto, até o momento, poucos produtos derivados do uso de alginato-liase foram desenvolvidos para aplicações terapêuticas, como antibacterianos, anticancerígenos e tratamentos de outras doenças. Desse modo, é essencial descobrir novas alginato-liases e explorar sua estrutura, funções e a relação entre estrutura e função para avançar na área da enzimologia marinha e biotecnologia (Barzkar *et. al.*, 2022).

No estudo de Daboor e colegas (2019), um total de 36 estirpes bacterianas alginolíticas foram isoladas de amostras de água do mar. Essas bactérias foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foi visto que a estirpe *Pseudoalteromonas* sp. 1400 apresentou a maior atividade alginolítica, com isso, sua enzima foi purificada (AlyP1400) e exibiu uma banda de 23 kDa em um gel de poli(acrilamida) para proteínas. A alginato-liase purificada mostrou uma atividade máxima a 30 °C, em condições levemente ácidas. Além disso, foi observado que a enzima reduziu em mais de 90% a viscosidade do alginato de sódio e diminuiu consideravelmente os biofilmes de *P. aeruginosa* PA14 em 69% após 24 horas. Foi realizado um teste da combinação da enzima com carbenicilina ou ciprofloxacina, reduzindo a espessura e a área de superfície do biofilme de *P. aeruginosa* em um sistema de célula de fluxo. Portanto, esses resultados indicam que a AlyP1400, em combinação com esses antimicrobianos, auxilia na degradação dos biofilmes produzidos por *P. aeruginosa*, apresentando potencial como estratégia terapêutica combinada para a degradação de biofilmes produzidos por *P. aeruginosa*.

Uma alginato-liase denominada AlyH1 foi produzida pela bactéria marinha *Vibrio furnissii* H1 isolada em algas deterioradas e apresentou propriedades interessantes quanto ao seu emprego no setor biomédico. Após a purificação e caracterização, a enzima apresentou uma atividade específica de 2,40 U/mg, com peso molecular de 35,8 kDa. Foi observado que AlyH1 é mais efetiva a 40 °C e pH 7,5, mostrando estabilidade em temperaturas abaixo de 30 °C e em pH neutro (7,0-8,0). A partir de análises parciais da sequência de aminoácidos, foi visto que AlyH1 pertence à família de PL 7, mostrando menos de 77% de identidade com outras liases conhecidas. Esses resultados indicam que AlyH1 tem potencial como um novo candidato para produção de oligossacarídeos de alginato com baixos graus de polimerização (Zhu *et al.*, 2018).

1.5.2.4 Celulase

As celulasas são hidrolases classificadas em três principais categorias: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases clivam ligações da celulose em dissacarídeos. Estes são degradados por exoglucanases em oligossacarídeos mais curtos. Há duas variantes de exoglucanases, uma atua a partir da extremidade redutora e outra da não redutora, ambas liberando celobiose. Esta última é transformada em glicose pelas β -glicosidases. Microrganismos marinhos, como algumas bactérias e fungos, são conhecidos pela produção de celulasas. Entre eles, destacam-se gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Bacillus* (Lopes *et al.*, 2023).

Essas enzimas tem sido comercializadas desde a década de 1960 e ainda apresenta algumas características passíveis de adaptação/melhoramento, como baixa atividade enzimática e estabilidade em certos ecossistemas associados à alta salinidade, forte acidez, forte alcalinidade e baixa temperatura. Estudos mais recentes sobre as celulasas têm crescido expressivamente devido ao seu papel crucial na produção de bioetanol a partir de biomassa rica em celulose. Estima-se que até 2035, a demanda mundial por etanol terá um aumento de 3,4 vezes (Trivedi *et al.*, 2015). O elevado custo de produção das enzimas é um fator restritivo importante para a comercialização da produção de bioetanol através da hidrólise enzimática. Por isso, encontra-se a necessidade da procura por fontes novas e potenciais celulasas para uma produção de bioetanol econômica em escala industrial (Carpio *et al.*, 2022). É notável que as celulasas microbianas extraídas do ambiente marinho demonstram uma maior estabilidade em várias condições adversas, como pH, temperatura e salinidade (Trivedi *et al.*, 2016). No mercado global de enzimas, a celulase é a terceira enzima industrial mais importante (aproximadamente 15%), logo após a amilase (aproximadamente 25%) e a protease

(aproximadamente 18%) (Trivedi *et al.*, 2016). Suas principais aplicações incluem as indústrias de combustíveis, papel e celulose, aromatizantes de alimentos, têxteis, farmacêutica, ração animal, detergentes, e tratamento de águas residuais (Bajaj e Mahajan, 2019).

Foi isolada uma celulase halotolerante, denominada Bc22Cel, a partir de uma estirpe marinha de *Bacillus* SR22, que foi isolada de uma espécie de coral *Siderastrea stellata* na Paraíba, Brasil. Após o isolamento, a enzima Bc22Cel passou por etapas de purificação e caracterização. A enzima purificada apresentou uma massa de aproximadamente 37 kDa. Seu pH ótimo para atividade foi de 6,5, enquanto sua temperatura ótima foi de 60 °C. Notavelmente, a Bc22Cel demonstrou ser halofílica, mantendo mais de 70% de sua atividade mesmo após pré-incubação com NaCl 1,5 M por 1 hora. Esses resultados sugerem que Bc22Cel é um promissor candidato para aplicações industriais, como a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar e seus derivados (dos Santos *et al.*, 2018).

Na pesquisa de Sankaralingam e outros (2018), foi feita a triagem enzimática das bactérias isoladas de sedimento marinho do litoral da Índia, através do meio Ágar Carboximetilcelulose. Após 72 horas de incubação, as culturas foram acrescidas com solução de vermelho Congo a 1,0% e deixadas em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas com solução de NaCl 1 M. Foi possível observar uma zona clara ao redor das colônias, sendo considerado indicador para atividade celulolítica. Portanto, a cepa com maior atividade celulolítica foi identificada através do sequenciamento do gene codificador do 16S rRNA, como *Bacillus megatarium* SSI. Em seguida, foi feita a purificação da enzima, a qual foi alcançada com rendimentos de 1,36, 4,6 e 8,2 vezes durante a precipitação com sulfato, cromatografia de troca iônica e filtração em gel, respectivamente. Ademais, foram analisadas as condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da celulase, que foram de 9,0 e 50°C, respectivamente. Os pesquisadores também analisaram a inibição do crescimento de fungos com uso da enzima purificada. Como resultado, a celulase inibiu o crescimento de fungos como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. Portanto, foi estabelecido que a celulase produzida pela bactéria marinha *Bacillus megatarium* SSI pode agir como um agente antifúngico.

1.5.3. Carboxilesterases

As carboxilesterases (CE) pertencem à superfamília de enzimas conhecida como esterases e lipases. Essas enzimas têm a capacidade de hidrolisar com eficácia uma ampla gama de compostos com diversidade estrutural que contêm um grupo funcional específico, incluindo

ésteres de ácidos carboxílicos, amidas e alguns tioésteres. Além de catalisar a hidrólise, algumas carboxilesterases também são responsáveis por catalisar reações de transesterificação. As carboxilesterases bacterianas de habitats com elevadas temperaturas, demonstram estabilidade térmica e tornaram-se enzimas interessantes para indústrias de formulações de detergentes, processamento de alimentos e farmacêutica.

Por isso, cada vez mais, aumentam-se os estudos com objetivo de identificar novas CEs e investigar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas específicas (Johan *et al.*, 2021).

1.5.3.1 Lipase

Lipases são hidrolases que decompõem triacilgliceróis em glicerol, diacilgliceróis, monogliceróis e ácidos graxos. Além disso, são capazes de realizar a transesterificação e a síntese de ésteres. São ativas contra substratos insolúveis em água, como triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa (Treichel *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2023). Esse grupo de enzimas têm recebido bastante atenção recentemente, como indicado pelo crescente número de estudos sobre as lipases na literatura. Isso porque esse grupo de enzimas é amplamente utilizado em diversos processos importantes para as indústrias de alimentos, farmacêutica, couro, cosméticos, detergentes, laticínios, bebidas e biorremediação (Sarmah *et al.*, 2018). O uso da lipase microbiana no mercado foi estimado em US\$590,2 milhões em 2023 (Chandra *et al.*, 2020). As lipases são incorporadas aos detergentes por sua capacidade de remover manchas oleosas, como manteiga e vestígios de óleo, que se mostram resistentes à remoção em situações comuns de lavagem (Nerurkar *et al.*, 2013). Diversas lipases de origem bacteriana marinha foram documentadas, apresentando propriedades únicas e notáveis, como tolerância ao sal, pH levemente ácido ou alcalino e temperatura reduzida (Navvabi *et al.* 2018).

Uma lipase com atividade em baixas temperaturas, proveniente de *Bacillus cereus* HSS, isolada no Mar Mediterrâneo, Egito, foi purificada e suas propriedades foram analisadas. A purificação total, com base na atividade dessa enzima, atingiu 438,9 vezes, registrando uma atividade enzimática de 632 U/mg de proteína. A enzima purificada obteve um peso molecular estimado em 65 kDa, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS). As condições ótimas para a atividade lipolítica foram estabelecidas como: 1,5 mM de concentração de substrato, concentração de enzima de 100 µl, pH igual a 6 e temperatura de 10°C. Além disso, foi analisada a influência do nível de salinidade, a qual a enzima demonstrou tolerância em concentrações de NaCl entre 1,5 e 4,5%. Para analisar uma possível aplicação dessa enzima, foi feito um teste com um pedaço de tecido de algodão branco, livre de sujidades,

sobre o qual foi acrescentado óleo de semente de algodão contendo 0,1% de corante vermelho Congo por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a secagem do tecido durante 5 minutos a 80 °C, esse tecido seco foi cortado em pedaços e tratado com a lipase a 10 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, o tecido tratado com a enzima foi lavado, sem esfregar, por 2 minutos e secou naturalmente. O controle foi considerado o pedaço de tecido com os mesmos procedimentos, com exceção do acréscimo da lipase. Foi observado que essa lipase ativa em baixas temperaturas é uma potencial candidata para uso na remoção de mancha de óleo em tecido e tratamento de resíduos oleosos. (Hassan, Abd El Latif e Beltagy, 2021)

Em busca de lipases que sejam ativas em temperaturas baixas, Guo e colaboradores (2021) investigaram estirpes bacterianas isoladas de sedimentos nas profundezas do mar. Para triagem de lipase, as bactérias foram cultivadas em placas contendo meio com 1% (v/v) Tween 80. Uma nova cepa, denominada gcc21, exibiu alta atividade lipolítica, mesmo em temperaturas baixas como 4 °C. Por isso, foi feita a identificação da estirpe gcc21 e foi sugerida como uma nova espécie de *Pseudomonas*, com base em suas características fisiológicas, bioquímicas e genômicas, recebendo o nome de *Pseudomonas marinensis*. Foi realizada análise do genoma dessa cepa, o qual foram descobertos dois novos genes que codificam lipases ativas em frio (Lipase 1 e Lipase 2). Em seguida, esses genes foram clonados e superexpressos em células de *E. coli*, e as lipases correspondentes foram posteriormente purificadas e caracterizadas. A temperatura de 4 °C foi ideal para atividades das duas enzimas, esse resultado é consideravelmente inferior à maioria das lipases ativas em frio já relatadas. No entanto, a atividade e a estabilidade da Lipase 2 mostraram-se superiores às da Lipase 1 em diferentes pHs e temperaturas. Além disso, a Lipase 2 provou ser mais resistente do que a Lipase 1 quando exposta a vários íons metálicos, detergentes, potenciais inibidores e solventes orgânicos. Esses resultados sugerem que as profundezas do mar representam uma fonte valiosa para a identificação de novas espécies bacterianas capazes de produzir enzimas ativas em frio com propriedades únicas (Guo *et al.*, 2021).

1.5.3.2 Esterase

As esterases pertencem à família das hidrolases lipolíticas, desempenham um papel importante na hidrólise de ésteres "simples" e geralmente apenas triglicérides compostos por ácidos graxos mais curtos que seis carbonos e formação de ligações éster. Devido à sua alta especificidade, essas enzimas são vistas como biocatalisadores valiosos para a obtenção de compostos de alta pureza óptica em sínteses químicas refinadas. Dentre os microrganismos

marinhos que produzem esterase, destacam-se representantes dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Vibrio* entre outros (Helistö e Korpela, 1998; Barzkar *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2023). As propriedades bioquímicas únicas das esterases, como ampla especificidade de substrato, não exigência específica de cofator e estabilidade em solventes orgânicos, as tornam catalisadores atrativos (Barzkar *et al.*, 2021). Sendo assim, essas enzimas são amplamente utilizadas na síntese de biopolímeros e biodiesel, nas indústrias alimentícia, de detergentes, farmacêutica, cosméticos, têxteis, papel e biorremediação (Panda e Gowrishankar, 2005; Barzkar *et al.*, 2021). Por isso, cada vez mais, aumentam-se as pesquisas acerca do isolamento e seleção de microrganismos produtores de novas esterases (Barzkar *et al.*, 2021).

Nessa lógica, os ambientes marinhos têm despertado considerável interesse da indústria, devido à uma grande oportunidade para a descoberta de novas esterases produzidas por bactérias marinhas com as propriedades desses ambientes (temperatura, pH e presença de sal) e capacidade de produção em larga escala de forma econômica e fácil. Portanto, o número de esterases extremófilas com características únicas provenientes de microrganismos marinhos continua em constante crescimento (Barzkar *et al.*, 2021).

A esterase microbiana produzida pela estirpe identificada como *Pseudomonas oryzae* HUP022, isolada do Oceano Pacífico, demonstrou uma tolerância notável à maioria dos solventes orgânicos, surfactantes e íons metálicos testados. Dessa forma, esse estudo sugere que essa enzima proveniente do mar profundo possui um enorme potencial para utilização nas indústrias químicas e farmacêuticas (Wang *et al.*, 2016).

Uma nova esterase ativa no frio foi descoberta por Rahman e colaboradores (2016). Essa enzima foi clonada a partir da bactéria marinha *Zunongwangia profunda*, isolada da água do mar em Fujian, China. A esterase foi superexpressa em *E. coli* BL21 (DE3) e purificada. Foi avaliada a influência da temperatura e pH na atividade enzimática, a qual apresentou atividade ideal em pH 8,0 e a 30°C, com ótima termoestabilidade e uma inativação acima de 60°C. Embora a enzima apresente 64% de semelhança com a esterase de *Chryseobacterium* sp. StRB126 (WP_045498424), a análise filogenética revelou que não possui semelhança com nenhuma das famílias estabelecidas de lipases/esterases, sugerindo que possa ser considerada como uma nova família. A elevada atividade em baixa temperatura e a estabilidade notável em solventes orgânicos e sais dessa nova família de esterase pode representar um novo biocatalisador, indicando seu enorme potencial para aplicações industriais.

1.5.4 Peptidase

Peptidases são classificadas em endopeptidases (EC 3.4.21-99) que atuam em regiões internas dos peptídeos, e as exopeptidases (EC 3.4.11-19) que atuam nas extremidades. Dentre os microrganismos marinhos que produzem peptidases, destacam-se *Streptomyces fungicidicus*, certas espécies de *Bacillus* (Barzkar et al., 2018; Lopes *et al.*, 2023). Devido a essa capacidade, as peptidases têm relevância na indústria farmacêutica, de alimentos, laticínios, ração animal, processamento de couro, detergentes, entre outras. Além disso, as proteases contribuem para a degradação de substâncias proteicas provenientes de resíduos de diferentes atividades industriais e biológicas (Homaei, Lavajoo e Sariri, 2016). Um diferencial das proteases é a capacidade de reagir em altas temperaturas, permitindo uma maior concentração de substrato e diminuindo o risco de contaminação microbiana (Homaei, Lavajoo e Sariri, 2016).

Conforme os estudos nessa área avançam, novas possibilidades emergem para aprimorar o uso de enzimas em diversos setores industriais. As peptidases marinhas apresentam uma resistência considerável em condições severas. Essa resistência é decorrente do metabolismo dos microrganismos adaptado ao habitat com condições extremas (Barzkar *et al.* 2018). Portanto, grande parte das proteases industriais, cerca de 65%, são obtidas de fontes microbianas marinhas, demonstrando resistência significativa a diversos solventes orgânicos e altas temperaturas. Essas características tornam as proteases mais versáteis e amplamente utilizadas na biotecnologia industrial (Homaei, Lavajoo e Sariri, 2016).

Um estudo relata o isolamento de bactérias a partir de sedimento marinho em Koh Jan, na Tailândia, a profundidades entre 9 e 24 metros. Foi feito o rastreamento da produção da peptidase com base no halo claro em torno das colônias evidenciado no meio Skim Milk Ágar (ágar de leite desnatado). As estirpes que apresentaram maior proporção entre a área clara e o diâmetro da colônia foram escolhidas e submetidas a testes de atividade da protease utilizando azocaseína como substrato. A estirpe bacteriana que demonstrou a maior atividade da enzima após 24 horas foi selecionada para experimentos posteriores. A bactéria que se destacou foi identificada como *Staphylococcus saprophyticus*. Foram realizados testes para avaliar a atividade da enzima frente a diferentes condições. Observou-se que a protease foi ativa em pH alcalino e em uma faixa extensa de temperatura (10–80 °C). Além disso, manteve a atividade e estabilidade notável a 60–80 °C, em pH (3,0–12,0), frente a inibidores e íons metálicos. A peptidase demonstrou estabilidade ao adicionar surfactantes (como o dodecil sulfato de sódio), agentes oxidantes (como H₂O₂), alvejantes (como zeólita) e solventes hidrofóbicos (como benzeno, hexanos e hexadecano). Em conclusão, as características dessa enzima ressaltam seu

potencial de aplicação em diversos setores industriais (Uttatree e Charoenpanicha, 2018).

Em outro estudo foi descrita a caracterização detalhada de duas peptidases adaptadas ao frio, produzidas por *Pseudoalteromonas issachenkonii* P14M1-4 e *Flavobacterium frigidimaris* ANT34-7, isoladas na Ilha do Rei George, Antártida. Foi efetuada a análise comparativa dessas duas enzimas com peptidases produzidas por bactérias não adaptadas ao frio, como *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Para a purificação e caracterização das peptidases, as condições ideais de temperatura de crescimento foram determinadas. Foi identificado que a enzima de *P. issachenkonii* P14M1-4 tem peso molecular de 40- 43 kDa, enquanto a peptidase de *F. frigidimaris* ANT34-7 tem 28 kDa. Os autores observaram que ambas as peptidases apresentaram adaptabilidade a diferentes condições de temperatura e pH, apresentando atividade ótima em temperaturas entre 35 °C e 40 °C e em pH neutro a alcalino. Foram classificadas como enzimas adaptadas ao frio, pois apresentaram as energias de ativação, constantes catalíticas e capacidades de crescimento em diferentes temperaturas. Dessa forma, os pesquisadores concluíram que as características exibidas de alta atividade em baixas temperaturas pelas peptidases do estudo, sugerem um grande potencial para aplicações biotecnológicas. Além disso, relataram que essa é a primeira caracterização de uma protease adaptada ao frio produzida por *F. frigidimaris* (Peralta-Figueroa *et al.*, 2021).

1.6 Enzimas do microbioma de esponjas

Embora as esponjas marinhas sejam consideradas organismos marinhos de notável simplicidade, são verdadeiros "complexos químicos" (Ruocco *et al.*, 2017). Isso porque os poríferos abrigam uma complexa comunidade simbiótica com uma ampla capacidade de produção de compostos secundários. Essas interações são essenciais, visto que a síntese desses compostos bioativos apresenta um papel de defesa química do hospedeiro, competição por espaço nos ambientes marinhos e adaptação aos estresses biológicos e ambientais. Dessa maneira, os simbiossitos das esponjas são reconhecidos por serem responsáveis pelo metabolismo e crescimento do hospedeiro, visto que, durante o processo de filtração do hospedeiro, o microbioma das esponjas possui acesso a uma vasta quantidade de matéria orgânica. Como resultado, esses microrganismos associados geram diferentes exoenzimas para converter essa matéria orgânica em nutrientes para o hospedeiro e até para outros organismos que residem nas proximidades da esponja (Santos-Gandelman *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2020). Em razão disso, a microbiota associada à esponjas pode representar fontes significativas de novos bioprodutos de relevância industrial (de Oliveira *et al.*, 2022).

O vasto conjunto de enzimas encontradas nas comunidades microbianas que residem no

holobionte das esponjas desperta interesse devido às suas características adaptáveis ao ambiente marinho, como a capacidade de tolerar diferentes salinidades, pH e temperatura, atributos altamente valorizados em diversas aplicações industriais (de Oliveira *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2022). Em relação aos biocatalisadores industriais provenientes do microbioma das esponjas, a classe de enzimas hidrolíticas é a mais extensivamente investigada, seguida pelas enzimas oxidoredutases. Dentro do grupo das hidrolases, as glicosídeo hidrolases (GHs) e as carboxilesterases correspondem cerca de 63% dos estudos, seguidas pelas peptidases (18%) e pesquisas que identificaram múltiplas atividades exoenzimáticas (12%), principalmente por meio de triagens em meio sólido (de Oliveira *et al.*, 2020). O filo Pseudomonodota abriga os principais produtores bacterianos, predominantemente da classe Gammaproteobacteria, seguido pelo filo Actinomycetota, no qual a maioria pertence ao gênero *Streptomyces*, e pelo filo Bacilota, todos pertencentes à família Bacillaceae. Em relação aos fungos, a classe Ascomycota é a mais prevalente, envolvendo principalmente os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cadophora* e *Penicillium*. Já em relação às Archaea, a maioria pertence ao filo Euryarchaeota (Malik e Furtado, 2019 a, b; Gaonkar e Furtado, 2018, 2020), seguido pelo filo Thaumarchaeota (Schleper *et al.*, 1997).

Além disso, o surgimento da "biotecnologia azul" tem impulsionado maior interesse nos compostos naturais provenientes do ambiente marinho, incluindo as enzimas, que são altamente valorizadas (Zhang e Kim, 2010; Oliveira *et al.*, 2020), assim como o crescente envolvimento comercial no mercado global de biotecnologia marinha, cuja projeção é de alcançar 6,64 bilhões de euros até 2026, com taxa de crescimento anual de 8,7% no período de 2021 a 2026 (Schneider *et al.*, 2022). Desse modo, as bactérias associadas às esponjas marinhas constituem uma fonte promissora com características singulares de produção enzimática, as quais tornam o processo industrial mais sustentável e econômico (Zhang e Kim, 2010; de Oliveira *et al.*, 2020, de Oliveira *et al.*, 2022). Isso porque a maioria dos processos industriais necessita de extremos de pH, temperaturas e salinidade. Com isso, há um notável aumento no interesse pelas "enzimas extremas" ou "extremoenzimas", que proporcionam métodos com menor consumo de energia (Dalmaso, Ferreira e Vermelho, 2015). No entanto, a investigação das enzimas produzidas pelo microbioma de esponjas ainda está em estágio inicial, apesar de terem sido identificados como fontes ricas de diversos biocatalisadores com potencial aplicação em setores como biorrefinaria, alimentação, detergentes e tratamento de efluentes (de Oliveira *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2022). Portanto, é fundamental investir em pesquisas voltadas para a exploração desse potencial biotecnológico, considerando a diversidade de aplicações industriais

que essas enzimas do microbioma de esponjas podem ter (Oliveira *et al.*, 2020; Karthik e Li, 2019).

1.7 Esponjas do gênero *Oscarella* em Cabo Frio (RJ, Brasil) e na França

Em fevereiro de 2013, onze espécimes de esponjas marinhas do gênero *Oscarella* foram coletados a 5 a 10 m de profundidade por mergulho, com as águas na faixa de temperatura de 15 a 18°C, na Ilha de Pargos e na Ilha Comprida, localizadas no litoral de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 3).



Figura 3: Registro da coleta de esponjas do gênero *Oscarella* realizada em Cabo Frio, (RJ, Brasil). (A) Local da coleta em fevereiro de 2013: Ilha de Pargos, localizada no litoral de Cabo Frio (Fonte: Google Maps, adaptado). (B) *Oscarella* spp., uma das amostras de esponjas marinhas, tombada sob o código MNRJ16475 (Foto cedida pelo Dr. Philippe Willenz, Université Libre de Bruxelles, Bélgica).

Em setembro de 2013, o presente grupo de pesquisa também participou de outra expedição de coleta de esponjas em cavernas submarinas da Ilha Maire, em uma profundidade de 10 a 13 m, no litoral da cidade de Marselha (França). Assim, amostras de três espécies de esponjas deste gênero foram analisadas nesse estudo, *Oscarella balibalo* (Figura 4), *Oscarella lobularis* e *Oscarella tuberculata* foram coletadas nessa expedição.

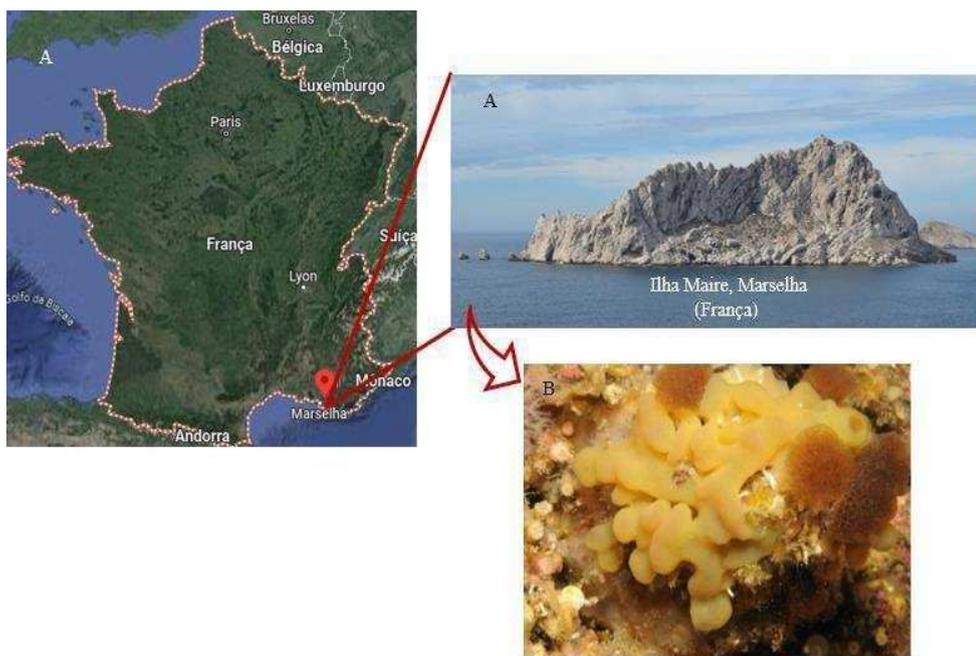


Figura 4: Registro da coleta de esponjas do gênero *Oscarella* realizada em Marselha (França). **(A)** Local da coleta em setembro de 2013: caverna submarina da Ilha Maire (Fonte: Google Maps, adaptado). **(B)** *Oscarella balibaloï*, uma das espécies de esponja coletada em cavernas no litoral de Marselha (Foto cedida pelo Dr. Alexander Ereskovsky, Institute Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie Marine et Continentale, França).

As amostras de esponjas marinhas foram processadas em condições assépticas e a partir do sobrenadante resultante, foram feitas diluições em série de 10 vezes em meio ágar BHI. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas e foram identificadas por meio da análise da sequência do gene codificador do 16S rRNA (Laport *et al.* 2017). Essas estirpes foram reativadas para a pesquisa desse trabalho.

Tabela 1: Bactérias isoladas de espécimes de *Oscarella* spp. coletados na Ilha de Pargos e na Ilha Comprida, em Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil).

Voucher Esponja	Local da coleta	Estirpe	Identificação molecular*
MNRJ 16474	Ilha Comprida	74-6B	<i>Bacillus</i> sp.
MNRJ 16474	Ilha Comprida	74-13B	<i>Photobacterium damsela</i>
MNRJ 16476	Ilha de Pargos	76-6B	<i>Exiguobacterium</i> sp.
MNRJ 16476	Ilha de Pargos	76-11B	<i>Exiguobacterium</i> sp.
MNRJ 16476	Ilha de Pargos	76-28B	Sem identificação
MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-5B	<i>Bacillus</i> sp.

MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-8B	<i>Bacillus</i> sp.
MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-11B	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-19B	<i>Shewanella</i> sp.
MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-20B	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
MNRJ 16477	Ilha de Pargos	77-23B	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-1B	<i>Acinetobacter</i> sp.
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-2B	<i>Acinetobacter</i> sp.
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-3B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-4B	Sem identificação
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-5B	Sem identificação
MNRJ 16478	Ilha de Pargos	78-7B	Sem identificação
MNRJ 16479	Ilha de Pargos	79-3B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16479	Ilha de Pargos	79-10B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16480	Ilha de Pargos	80-1B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16480	Ilha de Pargos	80-2B	<i>Shewanella</i> sp.
MNRJ 16480	Ilha de Pargos	80-7B	<i>Shewanella</i> sp.
MNRJ 16480	Ilha de Pargos	80-10B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16480	Ilha de Pargos	80-18B	Sem identificação
MNRJ 16481	Ilha de Pargos	81-4B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16481	Ilha de Pargos	81-5B	<i>Shewanella</i> sp.
MNRJ 16481	Ilha de Pargos	81-6B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-2B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-3B	<i>Enterococcus</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-14B	Sem identificação
MNRJ 16479	Ilha de Pargos	79-4B	Sem identificação
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-4B	Sem identificação
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-5B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-6B	Sem identificação
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-7B	<i>Enterobacter</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-8B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-9B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-11B	<i>Vibrio</i> sp.
MNRJ 16483	Ilha de Pargos	83-13B	Sem identificação

MNRJ 16484	Ilha de Pargos	84-2B	<i>Citrobacter</i> sp.
MNRJ 16484	Ilha de Pargos	84-3B	Sem identificação
MNRJ 16484	Ilha de Pargos	84-4B	Sem identificação
MNRJ 16484	Ilha de Pargos	84-5B	<i>Vibrio</i> sp.

* Afiliação taxonômica por análise das sequências do gene *rrs* (16S rRNA).

Tabela 2: Bactérias isoladas de espécimes de *Oscarella* spp. coletadas na Ilha Maire, Marselha (França)

Voucher esponja	Estirpe	Identificação por sequenciamento do gene <i>rrs</i> (16S rRNA)
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B1	<i>Aeromonas</i>
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B2	<i>Citrobacter</i>
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B4	<i>Raoultella</i>
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B6	<i>Pseudomonas</i>
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B8	<i>Aeromonas</i>
<i>Oscarella balibaloii</i>	Ob1B9	<i>Enterobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B1	<i>Citrobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B2	<i>Enterobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B3	<i>Citrobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B5	<i>Acinetobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B6	<i>Aeromonas</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B7	<i>Vibrio</i>

<i>Oscarella lobularis</i>	O11B10	Sem identificação
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B13	<i>Providencia</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O11B14	<i>Vibrio</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B1	<i>Thermoanaerobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B2	<i>Escherichia-Shigella</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B5	<i>Aeromonas</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B6	Sem identificação
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B7	<i>Citrobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B8	<i>Providencia</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B10	<i>Enterococcus</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B11	<i>Enterococcus</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O12B12	<i>Escherichia-Shigella</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O13B3	Sem identificação
<i>Oscarella lobularis</i>	O13B4	<i>Citrobacter</i>
<i>Oscarella lobularis</i>	O13B5	<i>Citrobacter</i>

2 JUSTIFICATIVA

O crescente interesse pelos microrganismos associados às esponjas deve-se à sua capacidade de sintetizar uma vasta gama de metabólitos bioativos com uma diversidade de potencialidades biotecnológicas, incluindo substâncias antimicrobianas, biossurfactantes, bioemulsificantes e enzimas. Estes compostos são especialmente valiosos por suas possíveis aplicações em diversas indústrias, como farmacêutica, química, têxtil e alimentícia (Laport, Santos e Muricy, 2009; Santos-Gandelman *et al.*, 2014; Zhang e Kim, 2010; de Oliveira *et al.*, 2020; Freitas-Silva *et al.*, 2022). Em particular, as enzimas estudadas a partir do microbioma de esponjas se notabilizam por apresentarem propriedades de adaptação ao habitat que as tornam promissoras para emprego nas condições industriais extremas (de Oliveira *et al.*, 2020).

Apesar dos estudos sobre os potenciais biocatalisadores industriais produzidos pela microbiota de esponjas *Oscarella* serem ainda incipientes, há altas chances de encontrar novas moléculas, tornando extremamente relevante e promissor o investimento em pesquisas focadas na exploração do holobionte porífero na frente biotecnológica (de Oliveira *et al.*, 2020). Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa evidenciaram algumas das suas capacidades biotecnológicas (Laport *et al.*, 2017; Freitas-Silva *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). No entanto, o presente trabalho, por sua vez, inova ao analisar a produção enzimática pelo microbioma de esponjas *Oscarella* coletadas em três locais distintos, incluindo ambientes cavernícolas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a produção de enzimas por bactérias isoladas de esponjas marinhas do gênero *Oscarella* coletadas no litoral de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil), em cavernas submarinas do litoral de Marselha (França) e do Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil).

3.2 Objetivos específicos

- a. Reativar as bactérias isoladas de esponjas marinhas do gênero *Oscarella* coletadas previamente em expedições realizadas em Cabo Frio (Brasil) e Marselha (França);
- b. Isolar as bactérias associadas às esponjas marinhas cavernícolas do gênero *Oscarella*

coletadas da Ilha do Meio e Ponta da Sapata do Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil);

- c. Identificar as bactérias isoladas dos espécimes de *Oscarella* spp. coletados no Arquipélago de Fernando de Noronha;
- d. Realizar a triagem da atividade de enzimas (amilase, agarase, alginato-liase, celulase, lipase, esterase e peptidase) com aplicações relevantes em biotecnologia das bactérias isoladas das esponjas do gênero *Oscarella* coletadas em diferentes locais;
- e. Realizar uma análise comparativa da atividade enzimática das bactérias de esponjas do gênero *Oscarella* coletadas em diferentes locais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reativação das bactérias isoladas de esponjas marinhas *Oscarella* spp. coletadas em 2013 em Cabo Frio (Brasil) e Marselha (França)

As estirpes bacterianas selecionadas de esponjas do gênero *Oscarella*, coletadas em Cabo Frio (Tabela 1), e estirpes bacterianas selecionadas a partir de bactérias isoladas de *Oscarella* spp. de Marselha anteriormente pelo grupo de pesquisa foram reativadas em seus respectivos meios de cultura usados para o estoque (BHI, do inglês, “*Brain Heart Infusion*”). Após o crescimento bacteriano com monitoramento diário em um período de 24 h a 96 h a 25 °C, as culturas das estirpes bacterianas foram testadas para a detecção primária da produção de diferentes enzimas em meios sólidos específicos de triagem enzimática, conforme detalhado no item 4.5.

4.2 Coleta de esponjas do gênero *Oscarella* de cavernas submarinas do Arquipélago de Fernando de Noronha (PE, Brasil)

O presente grupo de pesquisa, em colaboração com o Prof. Dr. Guilherme Muricy, coordenador do Laboratório de Biologia de Porifera do Museu Nacional (MN) da UFRJ, realizaram em 2022 duas expedições de coletas de espécimes de esponjas do gênero *Oscarella* nas cavernas da Ilha do Meio com 11,8 metros de profundidade e Ponta da Sapata com 15,6 metros, no Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil). A temperatura da água em ambos os locais era de aproximadamente 28 °C. Foram coletados seis espécimes de *Oscarella* spp. (MNRJ 24336, UFRJPOR 9137, UFRJPOR 9160, MNRJ 24275 (1), MNRJ 24275 (2) e MNRJ 24279) em maio de 2022 e cinco espécimes (MNRJ 29328, MNRJ 29329,

MNRJ 29257, MNRJ 29270 e MNRJ 29284) em novembro de 2022 (Figura 5).



Figura 5: Região de coleta de esponjas do gênero *Oscarella* realizada no Arquipélago de Fernando de Noronha (PE, Brasil). (A) Local da coleta: caverna submarina da Ilha do Meio (Fonte: Google Maps, adaptado). (B) *Oscarella* spp., um dos espécimes de esponja coletada na caverna da Ilha do Meio, em nov/2022, tombada sob o código MNRJ 29329 (Foto cedida pelo Prof. Dr. Guilherme Muricy, MN-UFRJ).

4.3 Isolamento das bactérias associadas às esponjas do gênero *Oscarella* coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha

As amostras de esponjas foram mantidas em água do mar artificial (ASW, do inglês, “artificial seawater”) estéril sob refrigeração até a chegada ao Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ. Assim, todas as amostras foram maceradas em condições assépticas com auxílio de um bastão de vidro e a partir do extrato resultante do macerado, foram preparadas diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-5}) as quais foram semeadas em diferentes meios de cultura adicionados de 1,5% de ágar bacteriológico: BHI, BHI diluído 1:10, Marine, Marine diluído 1:10, Meio Mineral Mínimo (com intuito de isolar bactérias produtoras de agarase) e Meio Mineral Mínimo suplementado com alginato de sódio (com objetivo de isolar bactérias produtoras de alginato-liase). Na fase de isolamento, todos os meios foram suplementados com anfotericina B (Sigma-Aldrich) ($1,0 \mu\text{g/mL}$) para inibição do crescimento fúngico. As placas semeadas foram incubadas à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e após 24 h a 72 h, as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram selecionadas de acordo com as características morfológicas, sendo purificadas e cultivadas no caldo BHI ou Marine. Após o crescimento bacteriano no respectivo caldo do meio

original de isolamento, todas as estirpes purificadas foram estocadas no mesmo meio de crescimento adicionado de glicerol a 20% (v/v), e mantidas na bacterioteca do laboratório a -20 °C. Os morfotipos bacterianos isolados receberam uma nomenclatura por meio de uma sigla que consiste nos dois últimos algarismos do voucher da esponja marinha da qual foi isolada, as iniciais do meio em que foi feito o isolamento bacteriano e a ordem de isolamento da UFC.

4.4 Identificação das bactérias isoladas de *Oscarella* spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha

As bactérias isoladas das amostras de esponjas do gênero *Oscarella* coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha foram identificadas em uma primeira etapa por espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS, do inglês, “*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*”). As culturas puras foram reativadas e cada estirpe foi semeada por esgotamento nos meios sólidos, seguido de incubação por 24 h a 25 °C. Em seguida, as estirpes foram transferidas com auxílio de uma haste de madeira estéril para a área delimitada da placa metálica de MALDI-TOF MS. Posteriormente, adicionou-se 1,0 µL de ácido fórmico em cada área e, após secagem, foram adicionados 1,5 µL de matriz específica (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). As placas com as amostras bacterianas preparadas foram encaminhadas para leitura no espectrômetro de massas (Bruker Daltonics). Dessa forma, a identificação das bactérias foi realizada de acordo com os valores de scores obtidos após passagem pelo espectrômetro de massas, relacionados à comparação e porcentagem de similaridade com o espectro de massa específico gerado e espectros pertencentes a cepas bacterianas de referência em um banco de dados integrado ao espectrômetro: $\geq 2,300$, indicado para confiança no nível de espécie; 2,299–2,000, para o nível de gênero e provavelmente para espécie; 1,700–1,999, apenas para gênero; e $< 1,699$ considerados não confiáveis para identificação (Seng *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2019).

4.5 Padronização do meio de triagem de alginato-liase

Inicialmente, a padronização do meio de triagem para alginato-liase foi conduzida com base em uma revisão de literatura, visando identificar as metodologias mais eficazes já utilizadas. Com isso, optou-se pelo meio de cultura descrito por Nakamura (1987), considerando-o como um ponto de partida para os experimentos, cujo a composição originalmente foi de 1% de alginato de sódio, 0,003% de bromotimol azul e 1,5% de ágar. No entanto, durante os testes iniciais, observou-se que as bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* não demonstravam crescimento neste meio. Diante disso, foi realizada uma

modificação na formulação do meio, adicionando 0,05% de peptona como uma fonte de nutrientes adicional. A interpretação do ensaio era realizada visualmente, conforme descrito pelo artigo, observando-se a formação de um halo azul ao redor da colônia bacteriana. O meio apresentava uma coloração verde, e a mudança de pH resultante da atividade de alginato-liase provocava a formação desse halo azul ao redor da colônia, indicando a capacidade das bactérias de degradar o alginato.

4.6 Triagem da produção de enzimas de interesse biotecnológico

As estirpes bacterianas isoladas de esponjas marinhas foram testadas para detecção da produção de diferentes enzimas, conforme apresentado a seguir. Alíquotas de 5,0 μ L das culturas crescidas a 25 °C em caldo BHI ou Marine foram semeadas em meios de triagem específicos para as respectivas enzimas (Anexo 1). Para as bactérias isoladas no meio BHI e BHI diluído, foram utilizados os seguintes meios: Meio LB suplementado de amido para avaliar atividade de amilase; Ágar Carboximetilcelulose (CMC) para celulase (Kasana *et al.*, 2008); Meio Sierra acrescido de Tween 80 ou de Tween 20 para lipase e esterase, respectivamente (Sierra, 1957); Ágar Leite Desnatado (Atlas, 2010) para peptidase. Ainda foram testados dois meios de triagem para a atividade agarolítica e alginolítica: Meio Mineral Mínimo (Thomas *et al.*, 2011) e Meio Hu para agarase (Hu *et al.*, 2009), Meio Mineral Mínimo suplementado de alginato de sódio e Meio com alginato e azul de bromotimol como indicador para alginato-liase (Nakamura, 1987) (Figura 6). Para as estirpes isoladas em Marine, Marine 1:10 e Meio Mineral Mínimo, a triagem enzimática foi feita com adição de ASW no preparo dos meios sólidos.



Figura 6: Perfil da composição de meios contendo substratos específicos para a detecção de atividade enzimática de bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella*. Representação de resultados positivos de

atividade enzimática para as sete enzimas avaliadas — amilase, agarase, alginato-liase, celulase, lipase, esterase e peptidase — em meios de cultura específicos desenhados para cada teste.

Após 24-72h de incubação a 25°C, as leituras dos resultados foram conduzidas especificamente para cada meio de triagem, pela observação da presença de uma zona de hidrólise ou precipitação dos subprodutos da reação ao redor do crescimento bacteriano. Por fim, o Índice Enzimático (IE) foi calculado pela razão entre o diâmetro de hidrólise e o diâmetro do crescimento bacteriano com mensuração em milímetros (mm). Foi considerado um potencial produtor da exoenzima sendo aquele com o valor de $IE \geq 2,0$ (Hankin e Anagnostakis, 1975). Os ensaios de triagem foram conduzidos em triplicata para as estirpes que exibiram um valor de $IE \geq 2,0$.

4.7 Análise comparativa da atividade enzimática das bactérias de esponjas coletadas em diferentes locais

O presente estudo propôs uma investigação comparativa da atividade enzimática das bactérias associadas a esponjas do gênero *Oscarella*, coletadas em locais com características ambientais diversificadas. As amostras foram obtidas tanto de ambientes de cavernas submarinas na Ilha de Maire, na França, na Ilha do Meio e na Ponta da Sapata em Fernando de Noronha, quanto de ambientes não cavernosos como Cabo Frio, na Ilha Comprida e na Ilha de Pargos. Buscou-se estabelecer conexões entre as condições ambientais e atividade enzimática das bactérias isoladas de esponjas *Oscarella*, permitindo avaliar o perfil adaptativo nas potenciais funções metabólicas das comunidades bacterianas cultiváveis. Por exemplo, foi analisado como a disponibilidade de nutrientes e os impactos antropogênicos podem influenciar a atividade enzimática de bactérias associadas a esponjas marinhas. Além disso, avaliou-se, por exemplo, se a diversidade e a abundância de gêneros bacterianos variavam de acordo com os diferentes ambientes de coleta e as condições ambientais registradas. Em particular, a atividade enzimática de cada gênero bacteriano foi comparada entre os locais, visando identificar padrões adaptativos específicos ao contexto ambiental de cada região coletada. A Figura 7 apresenta o esquema utilizado para visualizar as variáveis analisadas e suas inter-relações. Este diagrama foi fundamental para orientar a coleta de dados e a subsequente análise comparativa, permitindo uma avaliação detalhada para auxiliar na identificação de padrões e na formulação de hipóteses sobre as estratégias adaptativas das comunidades bacterianas estudadas nessas esponjas Homoscleromorpha.



Figura 7: Diagrama de rede representando análise feita sobre as relações entre as esponjas do gênero *Oscarella*, os fatores ambientais, locais de coleta, gêneros bacterianos isolados e as respectivas atividades enzimáticas.

5 RESULTADOS

5.1 Reativação das bactérias isoladas de esponjas marinhas *Oscarella* spp. coletadas em 2013 em Cabo Frio (Brasil) e Marselha (França)

A partir de 126 bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella*, coletadas em Cabo Frio, um total de 43 estirpes bacterianas foram reativadas (Tabela 1). Em relação às 31 estirpes isoladas de *Oscarella* spp. coletadas no litoral de Marselha, 27 estirpes foram reativadas (Tabela 2).

5.2 Isolamento das bactérias associadas às esponjas *Oscarella* spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha

Dos seis espécimes pertencentes ao gênero *Oscarella* coletadas em maio de 2022, foram isoladas 128 bactérias. Sendo 24 amostras isoladas no meio BHI, 28 no BHI diluído, 24 no meio Marine, 26 bactérias no Marine diluído, 13 no Meio Mineral Mínimo e 13 no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio (Tabela 3). Em relação à expedição de novembro de 2022, foi possível isolar um total de 116 bactérias dos cinco espécimes de esponjas do gênero *Oscarella*. Especificamente, foram isoladas 22 amostras bacterianas a partir do meio BHI, 4

estirpes no BHI 1:10, 22 amostras no meio Marine, 14 no meio Marine diluído, 30 no Meio Mineral Mínimo e 24 no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio (Tabela 4).

Tabela 3: Relação das amostras de esponjas *Oscarella* coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha em maio de 2022 e número total de bactérias isoladas por meio de cultura.

Amostra de esponja	BH I	BHI diluído 1:10	Marine	Marine diluído 1:10	Mineral Mínimo	Mineral Mínimo + alginato	Total
MNRJ 24336	4	6	4	4	4	4	26
UFRJPOR 9137	4	4	4	4	0	1	17
UFRJPOR 9160	4	4	4	4	4	4	24
MNRJ 24275 (1)	4	4	4	4	0	0	16
MNRJ 24275 (2)	4	4	4	4	1	0	17
MNRJ 24279	4	6	4	6	4	4	28
Total	24	28	24	26	13	13	128

Tabela 4: Relação das amostras de esponjas *Oscarella* coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha em maio de 2022 e número total de bactérias isoladas por meio de cultura.

Amostra de esponja	BHI	BHI diluído 1:10	Marine	Marine diluído 1:10	Mineral Mínimo	Mineral Mínimo + alginato	Total
MNRJ 29328	4	0	4	2	6	4	20
MNRJ 29329	4	0	4	2	4	6	20
MNRJ 29357	6	2	6	4	6	6	30
MNRJ 29270	4	1	4	2	6	4	21
MNRJ 24284	4	1	4	4	8	4	25
Total	22	4	22	14	30	24	116

5.3 Identificação das bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha

Como resultado da identificação por MALDI-TOF MS das 128 bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* na expedição de maio, destaca-se a predominância da espécie *Acinetobacter venetianus*, abrangendo 20,3% ($n = 26$) das estirpes. Seguido por *Vibrio alginolyticus* com

10,1% ($n = 13$) das estirpes identificadas (Figura 8). Entretanto, foi possível observar que a maioria das estirpes isoladas, totalizando 57,8% ($n = 74$), não pôde ser identificada por espectrometria de massas. Essa limitação na identificação é, em grande parte, atribuída às características do banco de dados utilizado pelo MALDI-TOF MS alimentado com espectros de bactérias de relevância médico-clínica e veterinária. Consequentemente, a falta de banco de dados para amostras ambientais impossibilita, muitas vezes, a identificação de bactérias de origem não-clínica e métodos moleculares de identificação devem ser realizados, como o sequenciamento do gene *rrs* (16S rRNA).

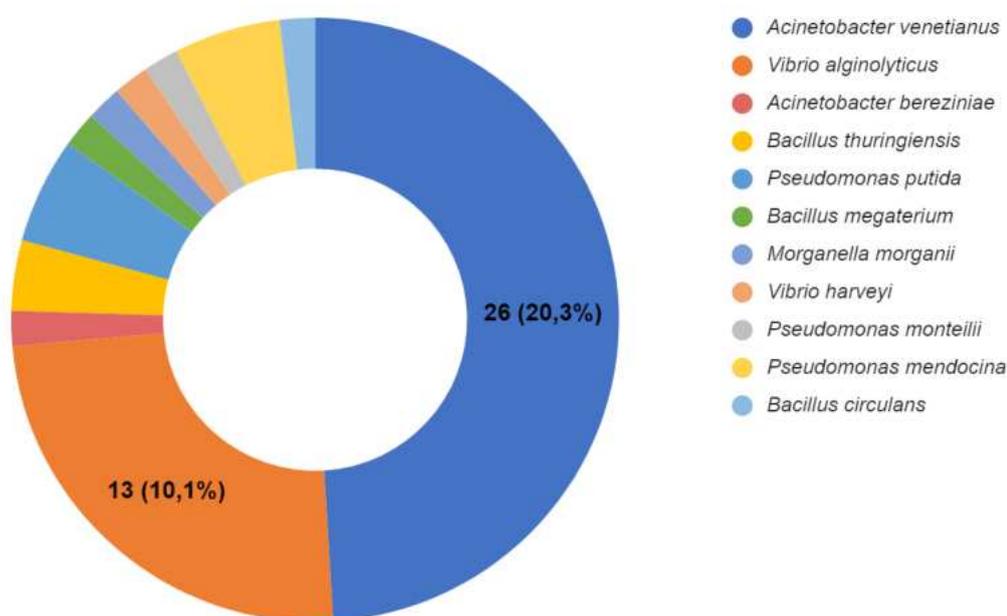


Figura 8: Identificação por MALDI-TOF MS das bactérias isoladas de esponjas cavernícolas do gênero *Oscarella* durante a expedição de maio de 2022 no Arquipélago de Fernando de Noronha: 20,3% ($n = 26$) identificadas como *Acinetobacter venetianus* (20,3%), 10,1% ($n = 13$) como *Vibrio alginolyticus*, 0,7% ($n = 1$) como *Acinetobacter bereziniae*, 1,5% ($n = 2$) como *Bacillus thuringiensis*, 2,3% ($n = 3$) como *Pseudomonas putida*, 0,7% ($n = 1$) como *Bacillus megaterium*, 0,7% ($n = 1$) como *Morganella morganii* (0,8%), 0,7% ($n = 1$) como *Vibrio harveyi*, 0,7% ($n = 1$) como *Pseudomonas monteilii*, 2,3% ($n = 3$) como *Pseudomonas mendocina*, 0,7% ($n = 1$) como *Bacillus circulans*.

Ao realizar a identificação através do MALDI-TOF MS das 116 bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* da coleta realizada em novembro no Arquipélago de Fernando de Noronha, diversas espécies foram identificadas, com uma dominância do gênero *Vibrio*. A mais recorrente foi *Vibrio harveyi*, detectada em 29,3% ($n = 34$) das estirpes, seguido de *Vibrio alginolyticus* com 18,9% ($n = 22$), *Vibrio fortis* com 4,3% ($n = 5$) e *Vibrio pelagius* com 2,5% ($n = 3$). Também foi possível identificar 2,5% ($n = 3$) como *Alteromonas macleodii* e 0,8% ($n = 1$) como *Bacillus pumilus* (Figura 9). No entanto, 41,3% ($n = 48$) das estirpes bacterianas não

foram identificadas, devido à limitação supracitada no banco de dados do equipamento.

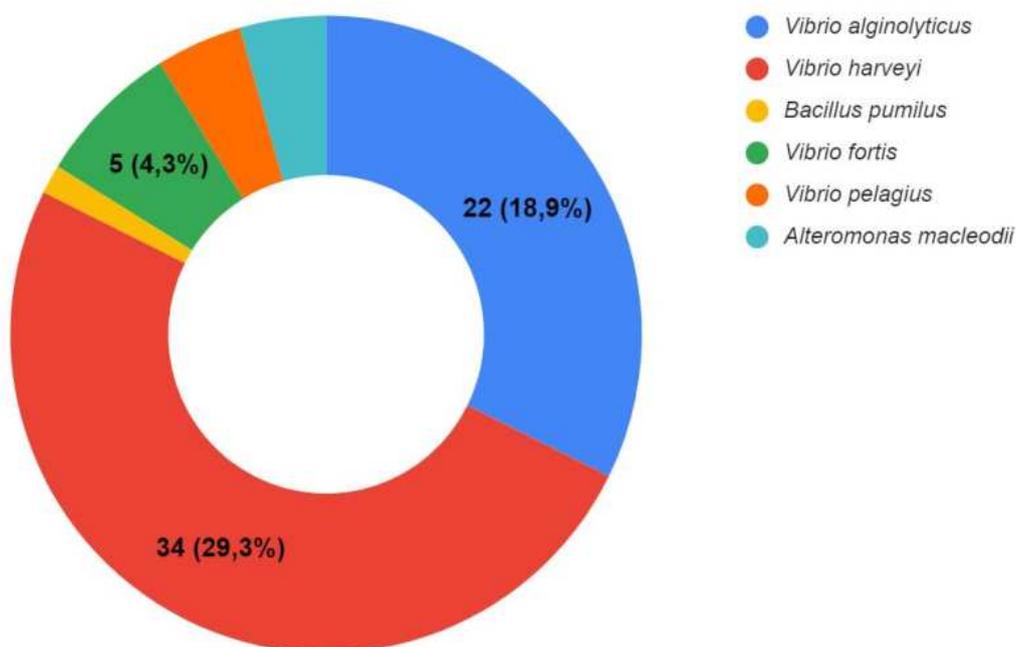


Figura 9: Identificação por MALDI-TOF MS das bactérias isoladas de esponjas cavernícolas do gênero *Oscarella* durante a expedição de novembro de 2022 no Arquipélago de Fernando de Noronha. 18,9% ($n = 22$) identificadas como *Vibrio alginolyticus*, 29,31% ($n = 34$) como *Vibrio harveyi*, 0,86% ($n = 1$) como *Bacillus pumilus*, 4,31% ($n = 5$) como *Vibrio fortis*, 2,59% ($n = 3$) como *Vibrio pelagius*, 2,59% ($n = 3$) como *Alteromonas macleodii*.

Portanto, considerando o total de 244 bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* coletadas nas duas expedições, a distribuição percentual das espécies identificadas foi a seguinte: *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* com 14,3% ($n = 35$) cada, *Acinetobacter venetianus* com 10,6% ($n = 26$), *Vibrio fortis* com 2,0% ($n = 5$), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Vibrio pelagius* e *Alteromonas macleodii* com 1,2% ($n = 3$) cada, *Bacillus thuringiensis* com 0,8% ($n = 2$), e *Acinetobacter bereziniae*, *Bacillus megaterium*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas monteilii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus* todos com 0,4% ($n = 1$) cada.

5.4 Triagem da produção de enzimas de interesse biotecnológico

Do total de 43 bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* de Cabo Frio, 5 (11,6%) foram potenciais produtoras para lipase, 7 (16,2%) para agarase no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar e 4 (9,3%) no meio de Hu (agarase). Para alginato-liase no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio foram detectadas 2 (4,6%) potenciais

produtoras e 9 (20,9%) potenciais alginolíticas no meio contendo azul de bromotimol (Meio Nakamura modificado) (Tabela 5). Das 27 bactérias isoladas na França, foi verificado um valor de $IE \geq 2$ para celulase em 2 (7,4%) amostras, 5 (18,5%) para lipase, 1 (3,7%) no Meio Mineral Mínimo contendo ágar e 18 (66,6%) para alginato-liase no meio contendo azul de bromotimol como indicador (Tabela 6).

Tabela 5: Relação do número total de bactérias isoladas de *Oscarella* spp. coletadas em Cabo Frio (RJ, Brasil) consideradas como potenciais produtoras ($IE \geq 2$) das respectivas enzimas investigadas.

Local de coleta	Quantidade de bactérias testadas	Lipase	Agarase (Meio Mineral Mínimo+ágar)	Agarase e (Meio Hu)	Alginato-liase (Meio Mineral Mínimo+ alginato-liase)	Alginato-liase (Meio Nakamura)
Cabo Frio	43 (100%)	5 (11,6%)	7 (16,2%)	4 (9,3%)	2 (4,6%)	9 (20,9%)

Tabela 6: Relação do número total de bactérias isoladas de *Oscarella* spp. coletadas em Marselha (França) consideradas como potenciais produtoras ($IE \geq 2$) das respectivas enzimas investigadas.

Local de coleta	Quantidade de bactérias testadas	Celulase	Lipase	Agarase (Meio Mineral Mínimo+ágar)	Alginato-liase (Meio Nakamura)
Marselha (França)	27 (100%)	2 (7,4%)	5 (18,5%)	1 (3,7%)	18 (66,6%)

Após a realização de duas expedições de coleta em Fernando de Noronha e a análise enzimática de um total combinado de 244 bactérias, foi detectada potencial atividade de amilase em 33 estirpes, representando 13,5% do total. Para a celulase, observou-se atividade em 119 estirpes (48,7%). Um total de 9% ($n = 22$) foram consideradas potenciais produtoras de lipase, 8,2% ($n = 20$) de esterase e 3,6% ($n = 9$) de peptidase. Em relação à produção de agarase, a atividade no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar foi detectada em 54,1% ($n = 132$) estirpes, enquanto no Meio Hu foi encontrada em 136 estirpes (55,7%). Por fim, 12,7% ($n = 31$) apresentaram potencial atividade de alginato-liase no Meio Mineral Mínimo contendo alginato de sódio e foi detectada em 1,6% ($n = 4$) estirpes no meio com azul de bromotimol (Meio Nakamura) (Tabela 7).

Tabela 7: Relação do número total de bactérias isoladas de *Oscarella* spp. coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha (PE, Brasil) consideradas como potenciais produtoras ($IE \geq 2$) das respectivas enzimas investigadas.

Bactérias isoladas	Amilase	Celulase	Lipase	Esterase	Peptidase	Agarase (MMM+ ágar)	Agarase (Meio Hu)	Alginato-liase (MMM+alginato)	Alginato-liase Meio Nakamura
244 (100%)	33 (13,5%)	119 (48,7%)	22 (9%)	20 (8,2%)	9 (3,6%)	132 (54,1%)	136 (55,7%)	31 (12,7%)	4 (1,6%)

Outro aspecto importante a ser analisado são os dados provenientes dos meios de isolamento bacteriano, que proporcionam uma visão sobre as capacidades enzimáticas em diferentes meios de cultivo. Em relação à primeira coleta realizada em maio de 2022, em Fernando de Noronha, um total de 24 bactérias foram isoladas no meio BHI. Sendo assim, 17 (70,8%) apresentaram potencial atividade para celulase, 5 (20,8%) para esterase, 3 (12,5%) para peptidase e 22 (91,7%) para agarase tanto no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar quanto no Meio Hu. Já no meio de isolamento BHI diluído 1:10, de 28 bactérias isoladas, 5 (17,9%) foram potenciais produtoras de amilase, 9 (32,1%) de celulase, 5 (17,9%) de lipase, 6 (21,4%) de agarase no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar e 4 (14,3%) no Meio Hu. No meio Marine, a partir de 24 bactérias isoladas e testadas, 4 (16,7%) apresentaram $IE \geq 2$ para atividade amilolítica, 21 (87,5%) para celulase, 4 (16,7%) para esterase, 20 (83,3%) para agarase no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar, 21 (87,5%) no Meio Hu e 6 (25%) para alginato-liase no meio Meio Mineral Mínimo suplementado de alginato de sódio. No meio Marine diluído 1:10, com um total de 26 bactérias isoladas, 3 (11,5%) obtiveram potencial atividade para esterase, 10 (38,5%) para agarase no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar, 8 (30,8%) no Meio Hu e 4 (15,4%) para alginato-liase no Meio Mineral Mínimo contendo alginato de sódio. No Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar, utilizado para o isolamento, de 13 bactérias, 1 (7,7%) teve $IE \geq 2$ para amilase, 2 (15,4%) para celulase, 4 (30,8%) para lipase, 3 (23,1%) para esterase, 1 (7,7%) para peptidase e 2 (15,4%) para agarase tanto no meio Meio Mineral Mínimo contendo ágar quanto no Meio Hu. Por fim, das 13 bactérias isoladas no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio, 2 (15,4%) apresentaram potencial atividade celulolítica, 5 (38,5%) para lipase, 5 (38,5%) para esterase, 3 (23,1%) para peptidase, 4 (30,8%) para agarase no meio Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar e 4 (30,8%) para alginato-liase no Meio Mineral Mínimo contendo alginato de sódio (Figura 10). A abordagem adotada na

adoção dos meios de isolamento inicial, portanto, desempenhou um papel crucial na pré-seleção das estirpes bacterianas produtoras das enzimas avaliadas, especialmente com a maximização das chances de identificar aquelas com atividades de agarase e de alginato-liase pelo emprego de meios mínimos com os respectivos substratos para enzimas adicionados como fontes exclusivas de carbono e energia.

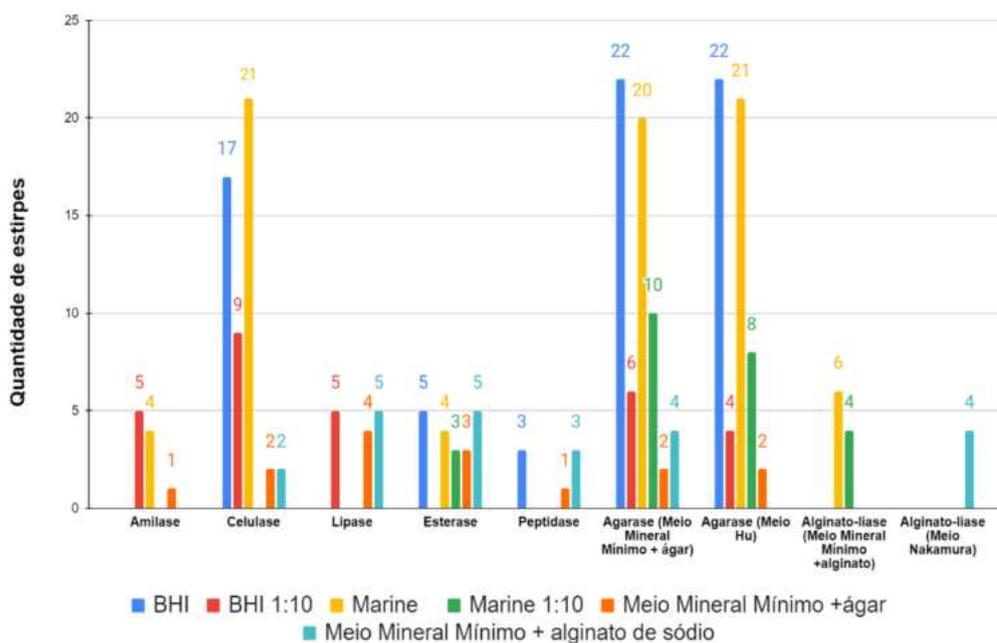


Figura 10: Distribuição do número total de amostras bacterianas potenciais produtoras das enzimas testadas isoladas de *Oscarella* sp. coletadas em maio de 2022 no Arquipélago de Fernando de Noronha em função dos diferentes meios de isolamento.

Em relação à análise dos dados provenientes da segunda coleta em Fernando, das 22 estirpes isoladas no meio BHI, das quais 11 (50%) mostraram potencial atividade para celulase e 11 (50%) para agarase no Meio Mineral Mínimo suplementado com ágar. No meio BHI 1:10, das 4 bactérias isoladas, 2 (50%) apresentaram $IE \geq 2$ para peptidase e 1 (25%) estirpe foi potencial produtora para agarase no Meio Hu. Das 22 bactérias isoladas no meio Marine, 9 (40,9%) apresentaram potencial atividade de amilase, 18 (81,8%) de celulase, 5 (22,7%) de lipase, 10 (45,5%) de agarase no Meio Mineral Mínimo contendo ágar e 15 (68,2%) no Meio Hu. Ademais, 4 (18,2%) apresentaram atividade de alginato-liase no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio. No meio Marine 1:10, 14 bactérias foram isoladas, sendo que 4 (28,6%) mostraram $IE \geq 2$ para celulase, 3 (21,4%) para lipase, 4 (28,6%) de agarase no Meio Mineral Mínimo contendo ágar e 5 (35,7%) no Meio Hu. No Meio Mineral Mínimo acrescido

de ágar utilizado no isolamento de 30 bactérias, 8 (26,7%) tiveram potencial atividade amilolítica, 11 (36,7%) de celulase, 19 (63,3%) de agarase no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar, 26 (86,7%) no Meio Hu e 14 (46,7%) de alginato-liase no Meio Mineral Mínimo suplementado com alginato de sódio. Das 24 bactérias isoladas no Mineral Mínimo contendo alginato de sódio, 6 (25%) apresentaram potencial atividade de amilase, todas as 24 (100%) para celulase e agarase tanto no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar quanto no Meio Hu, e 3 (12,5%) para alginato-liase no Mineral Mínimo com alginato de sódio (Figura 11).

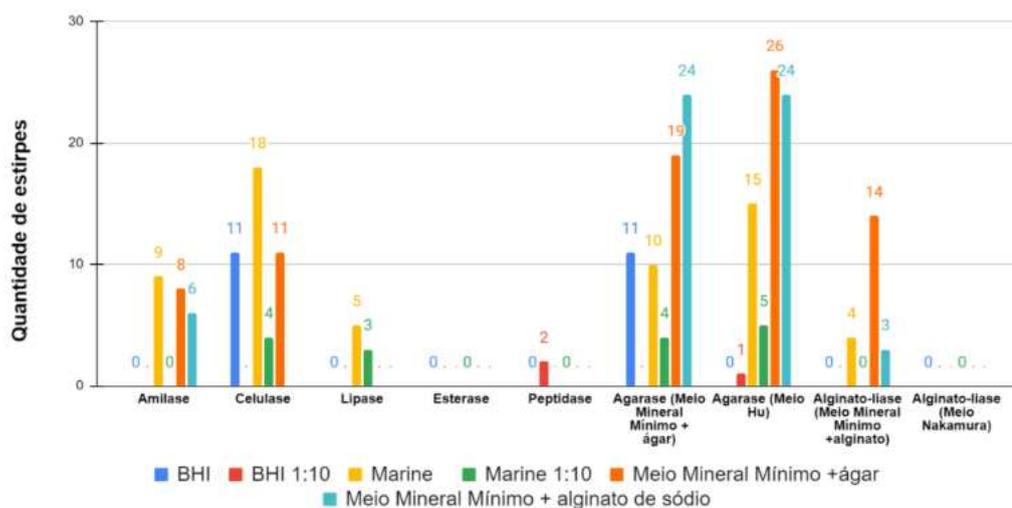


Figura 11: Distribuição do número total da quantidade de amostras bacterianas potenciais produtoras das enzimas testadas isoladas de *Oscarella* sp. coletadas em novembro de 2022 no Arquipélago de Fernando de Noronha em função dos diferentes meios de isolamento.

5.5 Bactérias com potencial capacidade multienzimática

Foi visto que determinadas estirpes bacterianas isoladas de esponjas *Oscarella* demonstraram mais de uma atividade enzimática em potencial ($IE \geq 2$). Em relação às 43 bactérias isoladas de esponjas de Cabo Frio (RJ, Brasil) foram identificadas 11,6% ($n = 5$) estirpes bacterianas que demonstraram atividade para duas enzimas: estirpe 76-28B (não identificada), *Bacillus* sp. 77-8B, *Shewanella* sp. 81-5B, *Vibrio* sp. 81-6B e *Acinetobacter johnsonii* 77-23B. Dentre as 27 bactérias cultiváveis isoladas de *Oscarella* coletadas em Marselha, (França), 18,5% ($n = 5$) estirpes obtiveram potencial atividade para duas enzimas distintas: *Aeromonas* sp. Ob1B1, *Pseudomonas* sp. Ob1B6, *Aeromonas* sp. Ob1B8, *Citrobacter* sp. O11B3 e *Aeromonas* sp. O11B6. Em uma abordagem integrada envolvendo as duas coletas no Arquipélago de Fernando de Noronha, um total de 244 estirpes bacterianas isoladas das esponjas *Oscarella* foram analisadas para determinar suas capacidades enzimáticas para mais

de uma enzima testada. As bactérias que demonstraram a capacidade de produzir duas enzimas de forma simultânea constituem a maior parte da análise, totalizando 86 estirpes, o que representa 35,2%. Dentre essas, destacam-se 19 estirpes identificadas como *Vibrio alginolyticus* (36B-2B, 75IB-1A, 75IB-1B, 75IB-2A, 75IIB-1B, 75IIB-1B, 75IIB-2A, 79B-1A, 28B-1A, 57B-2A, 70B-1B, 70B-2B, 84B-2A, 57M-2B, 57M-3B, 84M-2A, 84AG-4B, 57AL-1A e 57AL-2A); 9 identificadas como *Vibrio harveyi* (70M-2A, 28AG-3B, 29AG-1A, 29AG-1B, 29AG-2A, 70AL-1B, 70AL-2A, 70AL-2B e 84AL-1A. 5 como *Acinetobacter venetianus* (36AL-1A, 36AL-1B, 60PAG-1A, 60PAG-2B e 36AL-2B); 4 estirpes identificadas como *Vibrio fortis* (29M-2A, 57M-3A, 70AG-1A e 29AL-1); 2 como *Alteromonas macleodii* (29M1-1B e 70M1-1A); *Bacillus thuringiensis* 75IIB-1A; *Pseudomonas putida* 75IM-1A; *Bacillus circulans* 79AL-2B; *Bacillus megaterium* 75IIB1-1A; *Vibrio pelagius* 84M-1A e 42 estirpes não identificadas: 75IB-2B, 37PM-2A, 37PM-2B, 60PM-1A, 60PM-1B, 60PM-2A, 60PM-2B, 75IM-2A, 75IM-2B, 75IIM-1A, 75IIM-1B, 75IIM-2A, 79M-1A, 60PM1-1A, 75IM1-2B, 75IIM1-1A, 36AG-2B, 60PAL-2B, 28B-1B, 28B-2A, 28B-2B, 57B-2B, 84B-2B, 57M-1A, 29M1-1A, 57AG-2A, 70AG-1A, 70AG-1B, 70AG-2B, 84AG-1A, 84AG-4A, 28AL-2B, 29AL-1A, 29AL-2B, 29AL-3A, 29AL-3B, 57AL-1B, 57AL-2B, 57AL-3A, 57AL-3B, 84AL-1B, 84AL-2A.

Além disso, 9,4% ($n = 23$) estirpes foram potenciais produtoras para três enzimas distintas. Sendo 14 estirpes identificadas como *Vibrio harveyi* (36M-2B, 29M-1B, 70M-2B, 28AG-2A, 28AG-2B, 28AG-3A, 29AG-2B, 70AG-2A, 70AG-3B, 84AG-2B, 29AL-2A, 70AL-1A, 28AG-1A e 28AG-1B); 4 como *Vibrio alginolyticus* (36B-1A, 60PB-1A, 60PB-1B e 57M-2A); 3 foram identificadas como *Acinetobacter venetianus* (60PB-2A, 60PB-2B e 36AG-2A); 3 como *Pseudomonas mendocina* (60PAL-1B, 79AL-1B e 79AL-1B); 2 como *Alteromonas macleodii* (28M1-1A e 28M1-1B); *Acinetobacter bereziniae* 37PB-2B; *Vibrio fortis* 57AG-1A e 15 estirpes bacterianas não foram identificadas (36B-2A, 75IB1-1A, 75IB1-2A, 75IB1-2B, 75IIB1-1B, 75IIB1-2A, 37PM-1B, 75IIM-2B, 79M-1B, 79M-2B, 60PAG-2A, 60PAL-1A, 29M-2B, 57AG-2A e 84AL-2B).

Foi visto que 13 (5,3%) estirpes foram potenciais produtoras de quatro enzimas distintas simultaneamente. Dentre essas, 6 estirpes identificadas como *Vibrio harveyi* (28M-1B, 28M-2A, 28M-2B, 29M-1A, 28AL-1A e 28AL-1B); 2 estirpes identificadas como *Vibrio alginolyticus* (79M-2A e 28AL-2A); *Morganella morgani* 36M-2A e 3 não identificadas (75IIB1-2B, 37PM-1A e 28M-1A) (Tabela 8). Esses dados destacam a diversidade metabólica presente na microbiota das esponjas *Oscarella*.

Tabela 8: Quantidade de amostras bacterianas associadas a esponjas do gênero *Oscarella*, coletadas em diferentes localidades, com capacidade multienzimática.

Local	Quantidade de amostras capazes de produzir duas enzimas	Quantidade de amostras capazes de produzir três enzimas	Quantidade de amostras capazes de produzir quatro enzimas
Cabo Frio	5	0	0
Marselha	5	0	0
Fernando de Noronha	86	23	13

5.6 Análise comparativa da atividade enzimática das bactérias de esponjas *Oscarella* spp. coletadas em diferentes locais

Os resultados obtidos a partir da intersecção entre a atividade enzimática e as variáveis ambientais evidenciaram padrões que apontam para possíveis adaptações das bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* às condições específicas de cada local coletado. Essa abordagem metodológica foi desenhada para permitir uma pesquisa detalhada das interações entre as bactérias associadas às esponjas *Oscarella* e o ambiente marinho, contribuindo para o mapeamento da complexidade ecológica e biológica da microbiota de esponjas com base no perfil de rastreio da produção das enzimas avaliadas. Ao comparar as atividades enzimáticas das bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* em diferentes regiões, percebe-se distintas tendências: de sete enzimas testadas, três se sobressaíram no conjunto de bactérias isoladas de *Oscarella* de Cabo Frio. Sendo agarase e alginato-liase com maior destaque, com 16,7% ($n = 7$) e 20,9% ($n = 9$) de bactérias potenciais produtoras, respectivamente, seguido de lipase com 11,6% ($n = 5$) das bactérias. Em contraste, nas amostras da França, foram detectadas quatro enzimas com potenciais atividade enzimáticas. A alginato-liase foi predominante, com 66,6% ($n = 18$) das bactérias com IE maior ou igual a 2, seguido de lipase com 18,5% ($n = 5$) das bactérias, celulase com 7,4% ($n = 2$) e agarase com 3,7% ($n = 1$) das estirpes. Durante a análise da atividade enzimática das 244 estirpes bacterianas isoladas de esponjas coletadas nas duas expedições em Fernando de Noronha, as sete enzimas avaliadas obtiveram potenciais produtoras, representando uma maior diversidade enzimática, com destaque para as CAZymes. Revelou-se uma ampla presença de bactérias com atividade agarolítica, representando 58,8% ($n = 143$) do total. Adicionalmente, a potencial atividade de holocelulase foi observada em 48,7% ($n = 119$), amilase em 13,5% ($n = 33$), alginato-liase em 12,7% ($n = 31$), lipase em 9% ($n = 22$), esterase em 8,1% ($n = 9$) e peptidase em 3,6% ($n = 9$) estirpes (Figura 12).

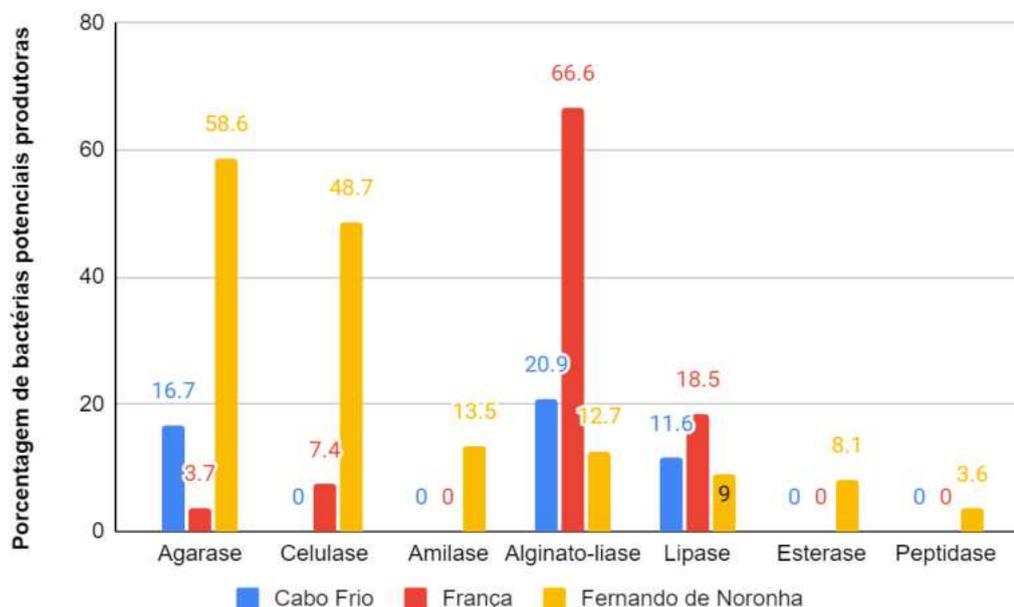


Figura 12: Gráfico representativo da porcentagem de estirpes bacterianas potenciais produtoras de enzimas isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* em diferentes locais (Ilha de Pargos e Ilha Comprida, Cabo Frio; Ilha de Maire, França; Ilha do Meio e Ponta da Sapata, Fernando de Noronha)

Na análise comparativa dos valores de IE mais elevados das bactérias isoladas de *Oscarella* em diferentes locais de coleta, destacaram-se algumas estirpes bacterianas. Em Cabo Frio, as estirpes *Bacillus* sp. 77-5B e 77-8B apresentaram uma média de IE igual a 7,3 para a enzima agarase, resultado este obtido após testes no Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar. Em relação às estirpes bacterianas isoladas de esponjas coletadas na França, a estirpe *Aeromonas* sp. Ob1B1 mostrou uma média de IE de 4,1 para holocelulase. Por sua vez, *Vibrio harveyi* 70AG-2A isolada de *Oscarella* coletada em Fernando de Noronha, obteve destaque com média de IE igual a 12,5 para agarase no teste utilizando o Meio de Hu, indicando uma capacidade enzimática expressiva. A representação visual desses resultados pode ser conferida na figura 13, onde as placas ilustram claramente o alto desempenho enzimático dessas estirpes bacterianas.

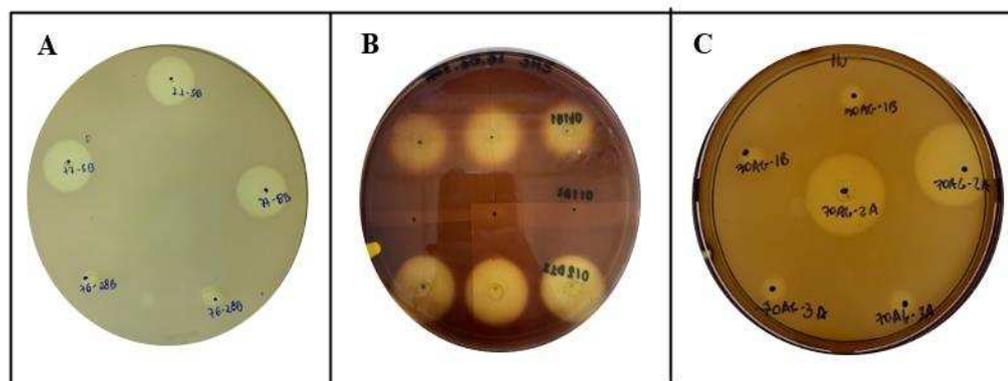


Figura 13: Imagens representativas do cultivo de bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* com valores de Índice Enzimático (IE) para as enzimas investigadas nos respectivos meios de rastreamento da atividade: (A) *Bacillus* sp. 77-5B e *Bacillus* sp. 77-8B com atividade de agarase com IE de 7,3, coletadas em Cabo Frio, Ilha de Pargos; (B) *Aeromonas* sp. Ob1B1 com atividade de celulase com IE de 4,1, isolada na França, Ilha de Maire; (C) *Vibrio harveyi* 70AG-2A com atividade de agarase com IE de 12,5, coletada em Fernando de Noronha, Ponta da Sapata.

Dentre as 43 bactérias isoladas de *Oscarella* coletadas em Cabo Frio, 11,6% ($n = 5$) estirpes demonstraram potencial produção para duas enzimas simultaneamente. Similarmente, das 27 bactérias isoladas de *Oscarella* em Marseille, na França, 18,5% ($n = 5$) mostraram capacidade para produzir duas enzimas distintas. Contudo, na análise das 244 bactérias isoladas de esponjas coletadas no Arquipélago de Fernando de Noronha, a diversidade enzimática foi evidente. Das estirpes analisadas, 35,2% ($n = 86$) estirpes demonstraram a capacidade de produzir duas enzimas de forma simultânea. Além disso, 9,4% ($n = 23$) foram capazes de produzir três enzimas distintas, e 5,3% ($n = 13$) estirpes apresentaram potencial para produzir quatro enzimas simultaneamente (Figura 14). A maior diversidade enzimática observada nas bactérias isoladas de *Oscarella* coletadas em Fernando de Noronha pode ser atribuída ao maior número de estirpes testadas em comparação com as outras regiões.

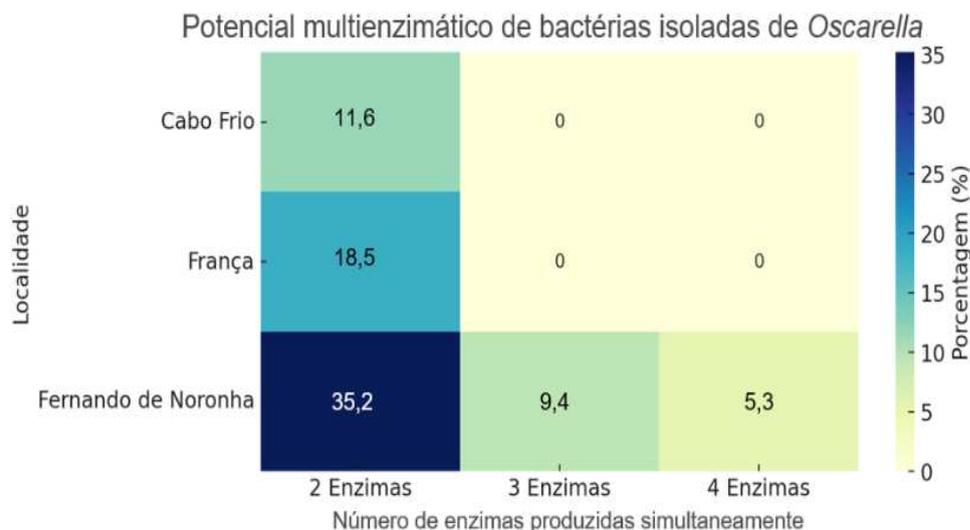


Figura 14: Análise comparativa da capacidade multienzimática em estirpes bacterianas isoladas de esponjas *Oscarella* em diferentes localidades: Este *heatmap* ilustra a porcentagem de bactérias capazes de produzir duas, três ou quatro enzimas em três localidades distintas: Cabo Frio, França e Fernando de Noronha.

Além disso, foi realizada uma análise das atividades enzimáticas de gêneros bacterianos iguais isolados de esponjas *Oscarella* coletadas em diferentes locais, proporcionando uma compreensão sobre a variabilidade enzimática destes microrganismos em resposta às variações ambientais de cada região. Em relação ao gênero *Vibrio*, foram isoladas 15 bactérias de esponjas coletadas em Cabo Frio, sendo que apenas 13,3% ($n = 2$) estirpes demonstraram potencial para produzir lipase e 20% ($n = 3$) para alginato-liase. As outras enzimas, incluindo amilase, celulase, esterase, peptidase e agarase, não foram identificadas nas amostras deste local. Das 2 estirpes bacterianas identificadas como *Vibrio* isoladas de *Oscarella* coletadas em Marselha, a atividade enzimática foi observada para alginato-liase, com ambas as amostras (100%) apresentando potencial para produzir essa enzima. Foi observada uma ampla diversidade enzimática acerca das 78 bactérias identificadas como *Vibrio* isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* coletadas em Fernando de Noronha. Foram identificadas 75,6% ($n = 59$) como potenciais produtoras de agarase, 60,3% ($n = 47$) de celulase, 29,5% ($n = 23$) de alginato-liase, 28,2% ($n = 22$) de amilase, 5,1% ($n = 4$) de peptidase, 5,1% ($n = 4$) de peptidase e 2,6% ($n = 2$) de lipase.

Com base nos resultados comparativos das bactérias identificadas como *Acinetobacter*, em Cabo Frio, das 5 estirpes isoladas, 20% ($n = 1$) apresentaram potencial para produzir agarase e alginato-liase. A única estirpe isolada e identificada como *Acinetobacter* isolada de *Oscarella* coletada em Marselha demonstrou potencial para produção de agarase e alginato-liase. Das 27 estirpes identificadas como *Acinetobacter* isoladas de *Oscarella* coletadas em Fernando de

Noronha, 33,3% ($n = 9$) apresentaram potencial atividade para esterase, 18,5% ($n = 5$) para agarase e para lipase, 14,8% ($n = 4$) para celulase e 7,4% ($n = 2$) para alginato-liase e 3,7% ($n = 1$) para amilase e para peptidase.

Em relação ao gênero *Bacillus*, das 3 bactérias isoladas de *Oscarella* coletadas em Cabo Frio, duas amostras (66,7%) mostraram-se como potenciais produtoras da enzima agarase e uma amostra (33,3%) como potencial produtora de alginato-liase. Não foram identificadas amostras potenciais produtoras das outras enzimas testadas. Além disso, também foram isoladas 4 estirpes bacterianas identificadas como *Bacillus* de esponjas carvenícolas coletadas em Fernando de Noronha, em que 3 amostras (75%) apresentaram potencial para produção de celulase e para agarase.

Das 7 estirpes identificadas como *Pseudomonas* isoladas de *Oscarella* coletadas em Fernando de Noronha, observou-se que 28,6% ($n = 2$) demonstraram potencial atividade de celulase e de lipase, 14,3% ($n = 1$) de esterase, de peptidase e de agarase. Em relação à única bactéria isolada e identificada como *Pseudomonas* da coleta da França, foi observado potencial para produção de lipase e alginato-liase, cada uma presente em 100% das amostras. A única estirpe de *Citrobacter* isolada de *Oscarella* coletada em Cabo Frio demonstrou apenas potencial atividade agarolítica. Já das 6 amostras de *Citrobacter* isoladas de *Oscarella* coletada na França, 66,7% ($n = 4$) mostraram potencial para produção de agarase e 16,7% ($n = 1$) para lipase. Portanto, essa análise comparativa das atividades enzimáticas de gêneros bacterianos isolados de esponjas *Oscarella* coletadas em locais distintos destaca a possível capacidade adaptativa desses microrganismos a diferentes ambientes.

As estirpes bacterianas com os mais elevados Índices Enzimáticos citadas acima, notavelmente *Bacillus* sp. 77-5B e 77-8B que foram isoladas da esponja *Oscarella* identificada pelo voucher MNRJ16477, coletada na Ilha de Pargos, em Cabo Frio. Adicionalmente, a *Aeromonas* sp. Ob1B1, isolada de *Oscarella balibaloï* coletada na Ilha de Maire, em Marselha. Por fim, a estirpe identificada como *Vibrio harveyi* 70AG-2A, isolada da esponja *Oscarella* com a coloração "vermelha" com voucher MNRJ 29270, coletada na Caverna da Ponta da Sapata, em Fernando de Noronha (Figura 15). Conclui-se que além das esponjas do mesmo gênero apresentarem diferenças morfológicas, foram coletadas em locais distintos, resultando no isolamento de diferentes gêneros bacterianos e na detecção de variadas enzimas. Essa diversidade de elementos pode sugerir uma correlação entre a diversidade microbiana, as características das esponjas e os ambientes marinhos específicos em que foram encontradas.

Essas conclusões destacam a complexidade das interações entre esponjas e bactérias em ecossistemas marinhos variados.

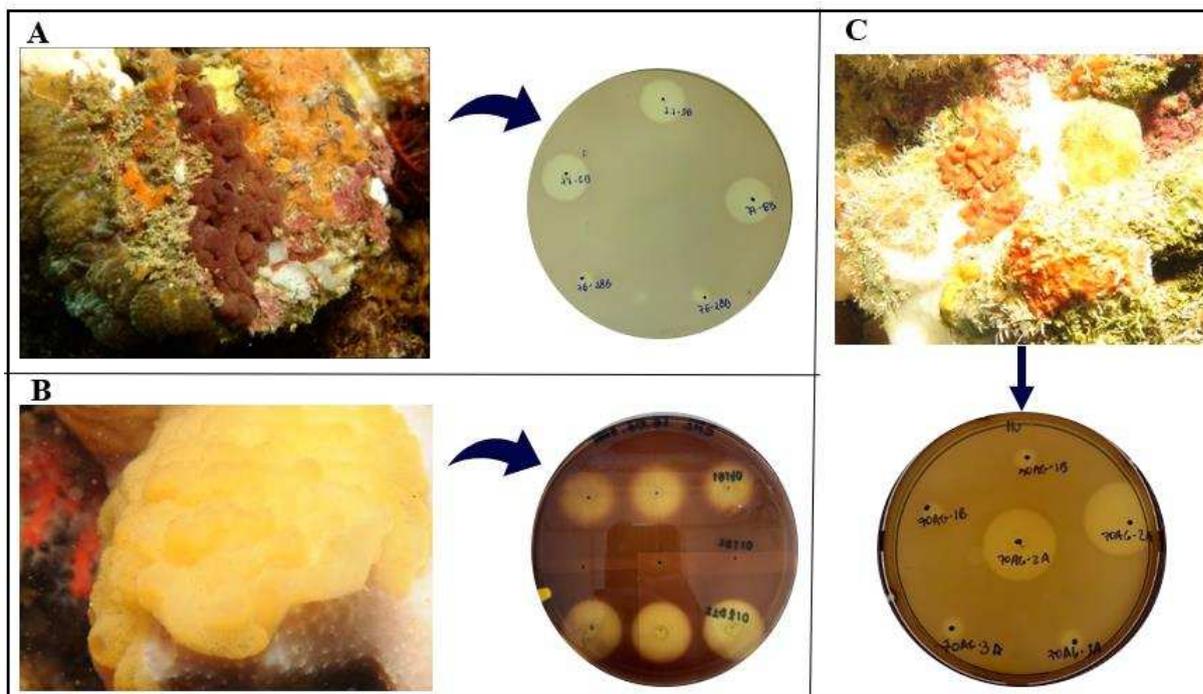


Figura 15: Representação de esponjas *Oscarella* coletadas em três locais distintos e as respectivas estirpes bacterianas isoladas dessas esponjas, as quais demonstraram os maiores Índices Enzimáticos. (A) Esponja *Oscarella* identificada pelo voucher MNRJ 16477, coletada na Ilha de Pargos, Cabo Frio, e as estirpes *Bacillus* sp. 77-5B e 77-8B, destacando sua potencial capacidade como produtoras de agarase. (B) Esponja *Oscarella balibaloii*, coletada na Ilha de Maire, França, e a estirpe *Aeromonas* Ob1B1 potencial produtora de celulase. (C) Esponja *Oscarella* “vermelha”, coletada na Caverna da Ponta da Sapata, Fernando de Noronha, e a bactéria agarolítica *Vibrio harveyi* 70AG-2A.

6 DISCUSSÃO

Os microrganismos marinhos são reconhecidos como uma fonte promissora para a descoberta de enzimas que possuem características únicas, sendo úteis para uma ampla gama de aplicações industriais (Lopes *et al.*, 2023). No entanto, estudos sobre a produção de compostos bioativos por bactérias associadas às esponjas marinhas ainda estão em estágio inicial (de Oliveira *et al.*, 2020). As cavernas submarinas representam grandes reservatórios de biodiversidade (Digenis *et al.*, 2022) e, portanto, podem constituir em ambientes interessantes para estudos focados em prospecção biotecnológica (dos Santos *et al.*, 2023). Em particular, esse estudo focou na análise das enzimas (amilase, celulase, lipase, esterase, peptidase, agarase e alginato-liase) produzidas por bactérias associadas à esponja marinha do gênero *Oscarella*, esponja cujos microbiomas associados ainda permanecem pouco caracterizados tanto em

termos de diversidade quanto em relação ao rastreamento de biomoléculas com atividades relevantes no âmbito biotecnológico. O estudo realizado por Laport e colaboradores em 2017 desempenhou um papel significativo na exploração da ecologia e biotecnologia relacionadas às esponjas do gênero *Oscarella*. Esta pesquisa concentrou-se na análise da comunidade bacteriana cultivável dessas esponjas, coletadas em Cabo Frio, Brasil, com um interesse particular em avaliar o potencial antimicrobiano dessas bactérias. A composição da comunidade bacteriana revelou-se majoritariamente de Pseudomonadota e Bacillota, com *Vibrio* sendo o gênero mais abundante, seguido por *Shewanella*. Muitas dessas estirpes mostraram atividades inibitórias contra bactérias clinicamente importantes, enfatizando o potencial das comunidades bacterianas associadas a *Oscarella*. Outra pesquisa do grupo, de Canellas *et al.* (2023) e Nunes *et al.* (2021), destacou a importância de novas abordagens no tratamento de infecções por biofilmes, que são responsáveis por uma grande parcela das infecções humanas e apresentam resistência aos antimicrobianos tradicionais. O estudo focou em demonstrar a capacidade de produção de substâncias bioativas capazes de inibir e desagregar biofilmes de *Staphylococcus* spp, por bactérias isoladas de esponjas *Oscarella*, especialmente a estirpe *Enterobacter* 84.3. Os resultados indicaram uma redução significativa na camada de biofilme de *S. aureus* sem causar toxicidade em células de mamíferos. No estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2022), a produção de hidrolases e biossurfactantes por bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* sp., *Plakina cyanorosea* e *Plakina cabofriense*, foi avaliada. Portanto, foi visto que estirpes bacterianas se destacaram por sua capacidade de produzir enzimas e biossurfactantes com propriedades de emulsificação e estabilidade notáveis. Esses achados demonstram o vasto potencial biotecnológico do microbioma dessas esponjas. No isolamento das 128 bactérias cultiváveis associadas às esponjas *Oscarella*, coletadas durante a expedição de maio para Fernando de Noronha, foi observado que os meios que apresentaram a maior quantidade de estirpes bacterianas isoladas foram BHI 1:10 ($n = 28$) e Marine 1:10 ($n = 26$). De acordo com a literatura, estes meios diluídos podem favorecer o crescimento de bactérias oligotróficas e permitir o desenvolvimento desses microrganismos mais abundantes, uma vez que em meios mais ricos nutricionalmente, essas bactérias poderiam ser inibidas ou cresceriam mais lentamente devido à competição (Madigan *et al.*, 2016). Em relação às 116 bactérias isoladas de *Oscarella* na coleta de novembro, o meio que mais se destacou com a quantidade de bactérias isoladas foi o Mineral Mínimo contendo apenas ágar como única fonte de carbono, com um total de 30 estirpes. A menor quantidade de bactérias viáveis de *Oscarella* coletadas em Marselha e em Cabo Frio pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a antiguidade das amostras, que datam de 10 anos atrás, aumentando a possibilidade das bactérias terem se

tornado inviáveis. Adicionalmente, a logística de transporte, especialmente da França para o Brasil, sem a refrigeração adequada, e a falta de armazenamento, ao longo desses anos, em condições ideais, como em um freezer a -80°C , podem ter sido cruciais na redução da viabilidade das bactérias.

Posteriormente, foi realizada uma ampla verificação da produção de sete enzimas por essas estirpes bacterianas, através de ensaios em placa com o meio contendo o substrato específico para cada enzima. A maioria dos meios de triagem enzimática foram padronizados, anteriormente, pelo grupo (Lopes, 2020), para atender às necessidades fisiológicas de bactérias quimiorganotróficas marinhas, simulando as condições de salinidade, nutrientes e favorecendo a produção da enzima testada. Por exemplo, para testar a produção enzimática das bactérias isoladas nos meios Marine, Marine 1:10, Meio Mineral Mínimo e Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio, que não cresciam em condições de baixa salinidade, foi utilizado a adaptação do uso de 50% de água do mar artificial (ASW) no preparo dos meios de triagem. Além disso, nesse presente estudo, foi realizada a padronização dos meios de triagem da atividade de alginato-liase. Para isso, realizou-se uma análise bibliográfica em busca dos meios mais apropriados para a seleção de estirpes produtoras de alginato-liase. Após experimentos com diferentes composições, foram estabelecidos o uso do Meio Mineral Mínimo contendo alginato de sódio como substrato e o Meio contendo alginato de sódio e azul de bromotimol como indicador da atividade alginolítica (Anexo I). O meio descrito por Nakamura em (1987) que contém o azul de bromotimol, foi utilizado com uma modificação: adição de peptona. Isso porque durante os ensaios para validar o meio de cultura, não se observou crescimento bacteriano no meio original, sem a adição de peptona. Dessa forma, para otimizar as condições e favorecer o desenvolvimento bacteriano, a peptona foi incorporada ao meio de triagem enzimática. Esta adição mostrou-se essencial para proporcionar os nutrientes necessários para o metabolismo e crescimento das bactérias cultiváveis isoladas de esponjas *Oscarella*, já que utilizam os aminoácidos e peptídeos presentes como fonte de carbono e nitrogênio.

Ao analisar os resultados da relação do isolamento em Meio Mineral Mínimo suplementado de ágar com a triagem de agarase, observou-se que, das 13 bactérias isoladas na coleta de maio, apenas 2 demonstraram potencial produção de agarase. Há uma variedade de fatores que podem explicar tal desfecho. Por exemplo, um tempo de incubação maior e uma concentração maior de células microbianas no inóculo poderiam ter sido necessários para a recuperação de um maior número de bactérias agarolíticas. Quando se trata do isolamento em Meio Mineral Mínimo contendo alginato de sódio como substrato, obteve-se um resultado

distinto. Das 13 estirpes isoladas nesse meio, todas se mostraram produtoras de alginato-liase, o que é um indicativo positivo da eficácia do meio para a seleção e cultivo de microrganismos com potencial na degradação de alginato de sódio. No entanto, é relevante destacar que somente 4 destas estirpes exibiram um IE maior ou igual a 2. O fato de o meio ter sido padronizado neste estudo e apresentar resultados de melhor visualização demonstra que a adaptação e otimização do meio foram bem sucedidas.

No isolamento das bactérias da coleta de novembro, observou-se a eficácia do Meio Mineral Mínimo contendo ágar com intuito de isolar bactérias agarolíticas. Das 30 estirpes bacterianas isoladas, 27 mostraram-se potenciais produtoras de agarase. Essa diferença em relação às análises das bactérias da coleta de maio pode ser atribuída ao período de incubação estabelecido, que foi de 48 a 72 horas. Este intervalo de tempo permitiu um crescimento bacteriano adequado e maior expressão da agarase. Em estudo de Lavín e colaboradores (2016), foi observado que a cepa *Flavobacterium faecale* INACH002, isolada de macroalga do gênero *Porphyra*) em decomposição, na Ilha King George, Antártica, demonstrou uma capacidade notável de degradar ágar apenas 48 horas após a inoculação. Além disso, foi relatado por Hosoda *et al.* (2003) que a estirpe identificada como *Paenibacillus* spp., começou a degradar ágar após 10 dias de cultivo. Geralmente, a atividade da agarase é mais evidente quando microrganismos são cultivados em meio com baixa concentração de nutrientes, utilizando ágar como única fonte de carbono (Lavín *et al.*, 2016). Portanto, a combinação do meio de cultivo específico com o tempo de incubação apropriado foi crucial para o sucesso na seleção dessas bactérias agarolíticas. Por outro lado, no Meio Mineral Mínimo acrescido de alginato de sódio, das 24 cepas isoladas, somente 3 apresentaram potenciais atividade de alginato-liase. Esse contraste pode ser explicado por diversas razões, sendo a principal, a dificuldade enfrentada durante o preparo do meio de cultura utilizado para identificação de estirpes produtoras de alginato-liase, devido à dificuldade de padronizar o ajuste do pH do meio contendo azul de bromotimol. Isso pode decorrer de componentes do meio que possuem atividade tamponante, como fosfato de amônio di-hidrogenado e o fosfato de potássio di-hidrogenado, ambos fosfatos são adotados amplamente como agentes tamponantes (Duan *et al.*, 2021).

A crescente demanda global por enzimas está sendo impulsionada por inovações em processos industriais (Maghraby *et al.*, 2023). Essas enzimas estão revolucionando diversos setores: na fabricação de produtos lácteos e na panificação, melhorando a qualidade e eficiência dos processos; na produção de bebidas como vinho e cerveja, influenciam positivamente no sabor e na qualidade; na indústria têxtil, na fabricação de papel, cosméticos e detergentes,

aumentando a eficiência e contribuindo para a sustentabilidade (Maghraby *et al.*, 2023). Portanto, no presente estudo foi realizada uma triagem para seis hidrolases (amilase, celulase, lipase, esterase, peptidase e agarase) e uma liase (alginato-liase) produzidas por bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella*, buscando ampliar o entendimento acerca das propriedades e possíveis aplicações biotecnológicas dessas enzimas. O estudo em questão revelou uma diversidade enzimática significativa entre as bactérias isoladas de esponjas do gênero *Oscarella*, provenientes de diferentes locais, incluindo Cabo Frio, França e Fernando de Noronha. A análise dos resultados indica uma variação notável na produção de enzimas específicas entre os locais. Isso porque das bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* coletadas em Cabo Frio, foi observado potencial produção de alginato-liase, agarase e lipase, enquanto as isoladas de *Oscarella* coletadas na França obteve-se destaque para alginato-liase, lipase e celulase. Em relação às bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* de Fernando de Noronha, as enzimas agarase, celulase e amilase se destacaram. Desse modo, o trabalho demonstrou a rica diversidade enzimática em microrganismos marinhos e a eficácia dos ensaios de triagem enzimática em meio sólido para seleção enzimática das bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* e sua diversidade enzimática, o que está alinhado com a literatura. Por exemplo, no estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2022), foram reativadas estirpes bacterianas oriundas de esponjas marinhas da classe Homoscleromorpha, coletadas na "Poça de Maré da Carolina", localizada na costa de Cabo Frio. Entre estas esponjas, uma pertencia ao gênero *Oscarella*. Essas estirpes foram selecionadas para análise da atividade de três hidrolases: celulase, peptidase e lipase. A metodologia da triagem enzimática adotada neste artigo foi similar ao presente estudo, também foi utilizado meio sólido contendo o substrato apropriado para a enzima testada. Foram utilizados os mesmos meios para triagem enzimática que o presente estudo para celulase (ágar CMC) e peptidase (Ágar Leite Desnatado). No entanto, para lipase foi utilizado o meio ágar tributirina. Este estudo evidenciou a presença de potenciais produtoras das hidrolases testadas entre as bactérias isoladas de esponjas da classe Homoscleromorpha. Adicionalmente, foi realizada a identificação das bactérias por MALDI-TOF MS e todas as estirpes isoladas de *Oscarella* sp. com atividade enzimática foram identificadas como *Bacillus pumilus*. Das 128 bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* na expedição de maio no Arquipélago de Fernando de Noronha, foram identificadas 12 espécies distintas, dentre essas, *Acinetobacter venetianus*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter bereziniae*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium*, *Morganella morganii*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas monteillii*, *Pseudomonas mendocina* e *Bacillus circulans*. Já na identificação das 116 estirpes bacterianas isoladas de esponjas do gênero *Oscarella* da coleta

realizada em novembro, 6 espécies foram detectadas: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fortis*, *Vibrio pelagius*, *Alteromonas macleodii* e uma estirpe foi identificada como *Bacillus pumilus*, um resultado em comum com estudo anteriormente citado (Oliveira *et al.*, 2022).

Ecologicamente, a predominância de determinadas atividades enzimáticas pode estar relacionada às características ambientais e antropogênicas de cada região. Por exemplo, o destaque da produção de agarase e alginato-liase por bactérias isoladas de esponjas *Oscarella* coletadas em Cabo Frio reflete-se provavelmente ao ambiente enriquecido com ágar e alginato de sódio, ambos polissacarídeos encontrados em algas marinhas (Lomartire e Gonçalves, 2023). Além disso, pode ser devido ao fenômeno de ressurgência em Cabo Frio, trazendo águas profundas ricas em nutrientes, possivelmente influencia a composição de polissacarídeos presentes. Além dessas enzimas, a atividade lipolítica foi bem evidente, o que pode ser explicado pelo aumento populacional e a expansão do turismo não planejado em Cabo Frio, agravando a problemática de despejo de poluentes no ambiente (Pereira, Gouveia e Dinis, 2022). Esta é uma das principais cidades turísticas do estado do Rio de Janeiro, e o fluxo intenso de visitantes e construções irregulares podem trazer consequências negativas ao meio ambiente. Segundo o Instituto Trata Brasil (2018), Cabo Frio possui uma população de 216.030 habitantes, dos quais 86.975 (40,26%) não têm acesso à coleta de esgoto. Além disso, 314 residências na cidade não contam com vasos sanitários. Portanto, agrava-se a problemática de despejo de resíduos sem tratamento prévio diretamente nas águas da região (Pereira, Gouveia e Dinis, 2022) que poderiam estar contribuindo para a microbiota da água do mar e de organismos holobiontes nessa região acabem sofrendo pressão para a produção de enzimas lipolíticas para consumo de resíduos domésticos e industriais com alto teor de gorduras.

A atividade proeminente de alginato-liase observada nas bactérias isoladas de *Oscarella* da Ilha de Maire, em Marselha, na França, o que pode estar relacionada à maior presença de macroalgas feofíceas, especialmente em cavernas, sugerindo que essas bactérias podem ter se adaptado a degradar compostos provenientes dessas algas. Em relação à elevada atividade lipolítica detectada, isso pode ser indicativo da presença de poluentes lipídicos no ambiente, que possivelmente está associado com a dinâmica portuária do local (Gerovasileiou e Bianchi, 2021). Isso porque a cidade de Marselha, situada às margens do Mar Mediterrâneo, enfrenta desafios ambientais crescentes, incluindo, um grande centro urbano e portuário, lidando frequentemente com questões de poluição marinha. O despejo inadequado de resíduos, tanto industriais quanto domésticos, tem levado a um aumento dos níveis de poluentes na água. Além

disso, o tráfego intenso de embarcações pode resultar em derramamentos de óleo e outros contaminantes (Cabioch, 2023).

Ao rastrear a atividade enzimática de bactérias de esponjas coletadas em cavernas da Ilha do Meio e Ponta da Sapata, no Arquipélago de Fernando de Noronha, foi notável a prevalência de atividades agarolítica e celulolítica. Esse perfil enzimático sugere uma adaptação das bactérias à degradação desses polissacarídeos presentes nas algas vermelhas e marrons, que são abundantes em cavernas submarinas (Digenis *et al.*, 2022; Knittweis *et al.*, 2015). O isolamento geográfico das ilhas oceânicas, mantêm esses ecossistemas quase inacessíveis, sendo afetados por fenômenos oceanográficos e climáticos e menos impactados por intervenções humanas em comparação às áreas na plataforma continental. Considerando a menor interferência antrópica e sua preservação natural, isso pode justificar o destaque das atividades de agarase e celulase encontradas nessas bactérias (Bastos, 2022). Em resumo, a variação na atividade enzimática observada em diferentes regiões pode refletir as adaptações das comunidades bacterianas às condições ambientais específicas e às pressões ecológicas de cada local. Foi realizada avaliação dos maiores valores de IE das bactérias cultiváveis em esponjas marinhas do gênero *Oscarella* coletadas em diferentes locais. Com isso, observou-se que as estirpes 77-5B e 77-8B, ambas identificadas como *Bacillus* spp., isoladas de esponjas coletadas em Cabo Frio, destacaram-se por seu elevado IE de 7,3 para produção de agarase. Esses dados condizem com a literatura, mesmo que os estudos sobre agarase produzidas por espécies do gênero *Bacillus* provenientes do ambiente marinho sejam escassos. Os autores, Khambhaty, Mody e Jha (2008), relataram o isolamento de *Bacillus megaterium*, uma bactéria marinha potencialmente produtora de agarase, proveniente da costa oeste da Índia. A triagem de bactérias produtoras de agarase foi realizada de forma semelhante ao presente estudo, o qual o ágar era a única fonte de carbono do meio sólido. A interpretação dos resultados também foi similar, a qual era visto as depressões ou zonas claras ao redor da colônia bacteriana. O trabalho de Kim e colaboradores (1999) relata uma β -agarase produzida por uma estirpe marinha identificada como *Bacillus cereus*.

Além disso, a estirpe *Aeromonas* sp. Ob1B1, isolada de esponja marinha do gênero *Oscarella* coletada em Marselha, na França, apresentou maior valor de IE, de 4,1, para atividade celulolítica. Esse dado obtido está de acordo com a literatura, *Aeromonas* spp. são conhecidas por produzirem celulases, com diversos estudos relatando o isolamento de tais estirpes de animais como moluscos e caracóis. Estes organismos, quando colonizados por bactérias produtoras de celulase, podem se beneficiar da degradação da celulose, indicando um possível

papel simbiótico entre eles (Canellas e Laport, 2022). No estudo realizado por Rohman e colaboradores (2021), bactérias foram isoladas a partir do intestino de peixe da espécie *Chanos chanos*, que naturalmente habita ambientes de água salobra na Indonésia. As bactérias purificadas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir celulase no ágar CMC. Com base no cálculo do Índice Enzimático, a estirpe identificada como *Aeromonas sobria* JC18 destacou-se como potencial produtora de celulase. Outro estudo foi o de Chakraborty e colaboradores (2019), o qual identificaram a cepa *Aeromonas hydrophila* ASM-S32 como potencial celulolítica, através de protocolos semelhantes ao do presente estudo.

Notavelmente, uma estirpe isolada de esponja do gênero *Oscarella* coletada em Fernando de Noronha, identificada como *Vibrio harveyi* 70AG-2A, registrou valor do IE de 12,5 para agarase. Embora a literatura sobre produção de agarase por *Vibrio harveyi* seja limitado. Um estudo de Fukasaw e Kobayashi (1986), relatou o isolamento 145 estirpes de água superficial costeira, em Itoh, Japão. A seleção de bactérias produtoras de agarase foi realizada utilizando um meio com ágar como substrato. Após a incubação a 25 °C durante 48 h, foi possível observar depressões causadas pela atividade agarolítica. Dentre essas bactérias com potencial atividade, uma foi identificada como *V. harveyi*.

No estudo de Cheba (2021), observou-se uma abordagem metodológica semelhante à nossa em termos de isolamento e triagem enzimática. As amostras de água, oriundas do Mar Vermelho no Egito, foram diluídas e semeadas em meio específico para detecção de agarase, contendo 1,5% de ágar como única fonte de carbono e 0,05% de extrato de levedura, dissolvidos em água do mar artificial. Das 42 estirpes bacterianas avaliadas para produção de agarase, cuja atividade foi revelada com lugol, a estirpe marinha R1 se sobressaiu. Esta, pertencente ao gênero *Vibrio*, demonstrou uma notável capacidade de produção de agarase, ao apresentar uma considerável zona clara ao redor da colônia bacteriana.

Um desafio enfrentado foi no preparo do meio de Nakamura utilizado para a identificação de bactérias produtoras de alginato-liase. Um problema era ajustar o pH desse meio, que contém azul de bromotimol. Suspeita-se que algum componente do meio possua atividade tamponante, o que dificulta a padronização do pH. Em resumo, embora tenham sido encontrados obstáculos durante o estudo, as soluções propostas têm o potencial de otimizar pesquisas futuras. A experiência adquirida destaca a importância do constante aprimoramento e adaptação em pesquisa científica.

As perspectivas futuras deste trabalho incluem seguir com análise da produção

enzimática, particularmente avaliando a atividade em meio líquido das estirpes que se destacaram na produção em meio sólido. Isso porque a literatura frequentemente relata que, em etapas subsequentes, a produção em meio líquido das estirpes promissoras será conduzida com o intuito de melhor compreender e caracterizar suas atividades enzimáticas. A eficácia dos rastreamentos de enzimas em meios sólidos é amplamente reconhecida. Após essa seleção inicial, o cultivo em meio líquido torna-se essencial para validar a produção de enzima. Dessa forma, essa etapa subsequente é necessária para determinar se há características bioquímicas necessárias e benéficas para o uso desses biocatalisadores microbianos em aplicações industriais (Fasim, More e More, 2021).

Embora preliminar, esta pesquisa produziu achados que podem sugerir uma avaliação mais aprofundada do potencial enzimático de bactérias associadas às esponjas *Oscarella* de diferentes locais e condições. Nesta lógica, o presente estudo destaca-se por ser um dos pioneiros ao realizar um rastreio extensivo de enzimas produzidas por bactérias cultiváveis de esponjas *Oscarella*, principalmente, por se tratar de algumas esponjas cavernícolas.

7 CONCLUSÕES

Este estudo obteve sucesso na reativação, isolamento e identificação de bactérias associadas a esponjas marinhas do gênero *Oscarella*, provenientes de Cabo Frio (Brasil), Marselha (França) e do Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil). Durante a triagem enzimática, os meios de triagem para atividade de alginato-liase foram padronizados nesse estudo, após leituras de artigos científicos e extensivos testes. Dessa forma, foi possível observar que as bactérias isoladas dessas esponjas apresentam um potencial significativo para a produção de diversas enzimas, incluindo amilase, agarase, alginato-liase, celulase, lipase, esterase e peptidase, com destaque para atividades simultâneas em várias dessas enzimas. Especialmente nas bactérias isoladas de *Oscarella* coletadas em Fernando de Noronha, onde observou-se uma variedade notável de atividades enzimáticas, com algumas estirpes demonstrando potencial para até quatro enzimas diferentes. A identificação dessas bactérias isoladas de *Oscarella* nas coletas de Fernando de Noronha, por MALDI-TOF MS, revelou uma predominância de *Acinetobacter venetianus* e *Vibrio harveyi*. A análise comparativa da atividade enzimática dessas bactérias de diferentes localidades destacou a diversidade biotecnológica presente e a possível influência das condições de cada ambiente. Este estudo, portanto, contribui significativamente para o conhecimento sobre a diversidade enzimática de bactérias associadas a esponjas marinhas, destacando-as como importantes reservatórios para a biotecnologia.

8 REFERÊNCIAS

- Agbo, J. A. e Moss, M. O. (1979). The isolation and characterization of agarolytic bacteria from a lowland river. *Microbiol.* 115(2), 355–368.
- Anteneh, Y. S., Yang, Q., Brown, M. H. e Franco, C. M. (2022). Factors affecting the isolation and diversity of marine sponge-associated bacteria. *App. Microbiol. Biotechnol.* 106(4), 1729-1744.
- 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. *Biogeochem.* 117(1), 5–21.
- Arundel, A. e Sawaya, D. (2009). *Biotechnologies in Agriculture and Related Natural Resources to 2015*. OECD Journal: General Papers. 2009(3), 7-111.
- Auta, H. S., Aboyeji, D. O., Bala, J. D., Abioye, O. P., Adabara, N. U., Aransiola, S. A., Hassan, A. e Aziz, A. (2022). Marine Microbial Enzymes: An Overview. In: *Ecological Interplays in Microbial Enzymology*.: Maddela, N.R., Abiodun, A.S., Prasad, R., eds. (Singapore, Springer), pp. 83-104.
- Bajaj, P. e Mahajan, R. (2019). Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *App. Microbiol. Biotechnol.* 103(21-22), 8711-8724.
- Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, e Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles.* 22(3), 335–346.
- Barzkar, N., Sheng, R., Sohail, M., Jahromi, S. T., Babich, O., Sukhikh, S. e Nahavandi, R. (2022). Alginate lyases from marine bacteria: An enzyme ocean for sustainable future. *Molecules.* 27(11), 3375.
- Barzkar, N., Sohail, M., Tamadoni Jahromi, S., Gozari, M., Poormozaffar, S., Nahavandi, R. e Hafezieh, M. (2021). Marine bacterial esterases: Emerging biocatalysts for industrial applications. *App. Biochem. Biotech.* 193, 1187-1214.
- Bastos, M. B. N. (2022). Tendências temporais das comunidades bentônicas recifais de Atol das Rocas e Fernando de Noronha. Trabalho de Conclusão de Graduação. (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 61f.
- Bäumgen, M., Dutschei, T e Bornscheuer, U. T. (2021). Marine polysaccharides: occurrence, enzymatic degradation and utilization. *ChemBioChem.* 22(13), 2247-2256.
- Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuar. Coast. Shelf. S.* 79(3), 341–353.
- Bhatt, P., Ahmad, S., Joshi, S. e Bhatt, K. (2022). Recent advancement in microbial enzymes and their industrial applications. In: *Industrial applications of microbial enzymes*. 1. ed. (CRC Press), pp. 1-17.
- Boury-Esnault, N., Latorv, 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.
- Boute, N., Exposito, J. Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K. e Garrone, R. (1996). Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol. Cell.* 88(1-2), 37-44.
- Brahmachari, G., Demain, A. L. e Adrio, J. L. (2017). Useful Microbial Enzymes - An Introduction. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. 1. eds. (Estados Unidos: Elsevier), pp. 1-37.
- Cabioch, B. (2023). Les grandes villes littorales et leurs plages. Une approche par les politiques publiques de gestion à Marseille (France), Barcelone e Valence (Espagne). Tese (Doutorado em Geografia) - Aix-Marseille Université, Marselha, França, 373f.
- Canellas, A. L. B. e Laport, M. S. (2022). The biotechnological potential of *Aeromonas*: A bird's eye view. *Crit. Rev. Microbiol.* 49(5), 543-555.
- Canellas, A. L. B., de Oliveira, B. F. R., Nunes, S. D. O., Malafaia, C. A., Amaral, A. C. F., Simas, D., Leal, I.

- C. R., Laport, M. S. (2023). Delving into the Mechanisms of Sponge-Associated Enterobacter against Staphylococcal Biofilms. *Molecules*. 28(12) 4843.
- Carpio, R. R., Secchi, S. G., Barros, R. O., Oliveira, R. A., Queiroz, S., Teixeira, R. S. S., Bon, E. P. S., Secchi, A. R. (2022). Techno-economic evaluation of second-generation ethanol from sugarcane bagasse: Commercial versus on-site produced enzymes and use of the xylose liquor. *J. Clean. Prod.* 369, 133340.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R. e Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb. Cell. Fact.* 19, 1-42.
- Cheba, B. A. (2021). *Vibrio* sp. R1 agarase: screening, production and substrate specificity. *WJPLS*. 7 (9), 138-144.
- Chi, W. J., Seo, J. W. e Hong, S. K. (2019). Characterization of two thermostable β -agarases from a newly isolated marine agarolytic bacterium, *Vibrio* sp. S1. *Biotech. Bioproc. Engin.* 24, 799-809.
- Contesini, F. J., Frandsen, R. J. N. e Damasio, A. (2021). CAZymes in Biorefinery: from genes to application. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 622817.
- Cornish-Bowden, A. (2011). History of enzyme chemistry. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Daboor, S. M., Raudonis, R., Cohen, A., Rohde, J. R. e Cheng, Z. (2019). Marine bacteria, a source for alginolytic enzyme to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mar. Drugs*. 17(5), 307.
- Dalmaso, G., Ferreira, D. e Vermelho, A. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar. Drugs*. 13(4):1925–1965.
- de Oliveira, B. F. R., Carr, C. M., Dobson, A. D. e Laport, M. S. (2020). Harnessing the sponge microbiome for industrial biocatalysts. *App. Microbiol. Biotech.*, 104(19), 8131-8154.
- de 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.
- de Oliveira, B. F. R., Freitas-Silva, J., Sánchez-Robinet, C. e Laport, M. S. (2020). Transmission of the sponge microbiome: moving towards a unified model. *Environ. Microbiol. Rep.* 12(6), 619-638.
- de Oliveira, T. S., de Oliveira, B. F. R., de Andrade, F. C. C., Guimarães, C. R., de Godoy, M. G. e Laport, M. S. (2022). Homoscleromorpha-derived *Bacillus* spp. as potential sources of biotechnologically-relevant hydrolases and biosurfactants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38(10), 169.
- 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.
- de Voogd, N.J.; Alvarez, B.; Boury-Esnault, N.; Carballo, J.L.; Cárdenas, P.; Díaz, M.-C.; Dohrmann, M.; Downey, R.; Hajdu, E.; Hooper, J.N.A.; Kelly, M.; Klautau, M.; Manconi, R.; Morrow, C.C. Pisera, A.B.; Ríos, P.; Rützler, K.; Schönberg, C.; Vacelet, J.; van Soest, R.W.M. (2023). World Porifera Database. Accessed at <https://www.marinespecies.org/porifera> on 2023-04-20. doi:10.14284/359.
- Diaz, M. C., Smith, K. P. e Rutzler, K. (2004). Sponge species richness and abundance as indicator of mangrove epibenthic community health. *Atoll Res. Bull.* 518:1-17.
- Digenis, M., Arvanitidis, C., Dailianis, T. e Gerovasileiou, V. (2022). Comparative study of marine cave communities in a protected area of the South-Eastern Aegean Sea, Greece. *J. Mar. Sci. Eng.* 10(5), 660.
- Dionisi, H. M., Lozada, M. e Olivera, N. L. (2012). Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 46-90.
- dos Santos, G.S., Souza, T.L., Teixeira, T.R., Brandão, J.P.C., Santana, K.A., Barreto, L.H.S., Cunha, S.S., Santos, D.C.M.B., Caffrey, C.R., Pereira, N.S. e Santos Júnior, A.F. (2023). Seaweeds and Corals from the Brazilian Coast: Review on Biotechnological Potential and Environmental Aspects. *Molecules*. 28(11), 4285.
- 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

- Duan, P., Liu, X., Liu, B., Akram, M., Li, Y., Pan, J., Yue, Q., Gao, B. e Xu, X. (2021). Effect of phosphate on peroxymonosulfate activation: Accelerating generation of sulfate radical and underlying mechanism. *Appl. Catal. B: Environ.* 298, 120532.
- Ereskovsky, A. V., Borisenko, I. E., Lapebie, P., Gazave, E., Tokina, D. B. e Borchiellini, C. (2015). *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha, Porifera) regeneration: epithelial morphogenesis and metaplasia. *PLoS one.* 10(8), e0134566.
- 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.
- Erfanimoghadam, M. R. e Homaei, A. (2023). Identification of New Amylolytic Enzymes from Marine Symbiotic Bacteria of *Bacillus* Species. *Catalysts.* 13(1), 183.
- Fasim, A., More, V. S. e More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 69, 68-76.
- Fransozo, A., Negreios-Fransozo, M. L. (2017). Porifera. In: *Zoologia dos Invertebrados*, eds. 7. ed. (São Paulo: Roca), pp. 168- 200.
- Freitas-Silva, J., de Oliveira, B. F. R., Dias, G. R., de Carvalho, M. M. e Laport, M. S. (2022). Unravelling the sponge microbiome as a promising source of biosurfactants. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 1- 16.
- 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(5), 807-815.
- Fukasawa, S. e Kobayashi, H. (1987). Properties of the Agarase from a Luminous Bacterium, *Vibrio harveyi*. *Agric. Biol. Chem.* 51(1), 269-270.
- 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.
- Gavande, P. V., Goyal, A. e Fontes, C. M. (2023). Carbohydrates and Carbohydrate-Active enZymes (CAZyme): An overview. *Glycoside Hydrolases.* 1-23.
- 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. *Hydrobiol.* 687(1), 3–10.
- 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-Generative Subdivision of Homoscleromorph Sponges (Porifera, Homoscleromorpha). *PLoS ONE.* 5(12), e14290.
- 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.
- Gerovasileiou, V. e Bianchi, C.N. (2021). *Mediterranean Marine Caves: A Synthesis of Current Knowledge.* (CRC Press), *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 59. Taylor & Francis, pp. 1-88.
- Gerovasileiou, Vasilis e Voultsiadou, Eleni. (2012). Marine caves of the Mediterranean Sea: a sponge biodiversity reservoir within a biodiversity hotspot. *PLoS One.* 7 (7), e39873.
- Ghattavi, S. e Homaei, A. (2023). Marine enzymes: Classification and application in various industries. *Int. J. Biol. Macromol.* 123136.
- Ginting, E. L., Wantania, L., Moko, E. M., Tumbol, R., Siby, M. e Wullur, S. (2021). Isolation and identification of thermophilic amylolytic bacteria from Likupang Marine Hydrothermal, North Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas J. Biol. Div.* 22(6).

- Global Markets Insights. (2023). Global Enzymes Market Growth 2018-2024 Industry Share Analysis. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/press-release/enzymesmarket.html#:~:text=According%20to%20a%20new%20report,reach%20%2410%2C519%20million%20in%202024%2C>. Acesso em 18/06/2023.
- 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., Wehrl, 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.
- Guo, C., Zheng, R., Cai, R., Sun, C. e Wu, S. (2021). Characterization of two unique cold-active lipases derived from a novel deep-sea cold seep bacterium. *Microorganisms.* 9(4), 802.
- Hankin, L. e Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycol.* 67, 597-607.
- Hassan, S. W., Abd El Latif, H. H. e Beltagy, E. A. (2022). Purification, Characterization and Application of a Cold Active Lipase from Marine *Bacillus cereus* HSS. 50(1): 71-80
- He, M., Guo, M., Zhang, X., Chen, K., Yan, J. e Irbis, C. (2018). Purification and characterization of alginate lyase from *Sphingomonas* sp. ZH0. *J. Biosci. Bioeng.* 126(3), 310-316.
- 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.
- Homaei, A., Lavajoo, F. e Sariri, R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Int. J. Biol. Macromol.* 88, 542-552.
- 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.
- Hosoda, A., Sakai, M. e Kanazawa, S. (2003). Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(5), 1048-1055.
- 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.
- Huang, H., Zheng, Z., Zou, X., Wang, Z., Gao, R., Zhu, J., Hu, Y. e Bao, S. (2022). Genome analysis of a novel polysaccharide-degrading bacterium *Paenibacillus algicola* and determination of alginate lyases. *Mar. Drugs.* 20(6), 388.
- Huston, A. L. (2008). Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes. In *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology.* (Berlin, Heidelberg, Springer), pp. 347-363.
- Imran, M. e Ghadi, S. C. (2019). Role of carbohydrate active enzymes (CAZymes) in production of marine bioactive oligosaccharides and their pharmacological applications. In: *Enzymatic technologies for marine polysaccharides,* eds. (Boca Raton: CRC Press), pp. 357-374.
- 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.
- Johan, U. U. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Kamarudin, N. H. A. e Ali, M. S. M. (2021). An integrated overview of bacterial carboxylesterase: Structure, function and biocatalytic applications. *Colloids Surf. B.* 205, 111882.
- Karigar, C. S. e Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res.* 2011(11).

- Karthik, L. e Li, Z. (2019). Marine enzymes from microbial symbionts of sponges and corals. In: Symbiotic microbiomes of coral reefs sponges and corals, eds. (Dordrecht, Springer), pp. 527-542.
- 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.
- Khakraborty, S., Joy, Z. F., Haque, A., Iqbal, A., Akhter, S., Sarker, P. K. e Sayem, M. A. (2019). Optimization of production and partial characterization of cellulase and protease enzymes from *Aeromonas hydrophila* ASM-S32. *J. Adv. Biotechnol. Exp. Ther.* 2.
- Khambhaty, Y., Mody, K. e Jha, B. (2008). Purification, characterization and application of a novel extracellular agarase from a marine *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 584-591.
- 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. Lett.* 21(11), 1011-1015.
- Knittweis, L., Chevalloné, P. A., Ereskovsky, A., Schembri, J. J. e Borg, J. A. (2015). A preliminary survey of marine cave habitats in the Maltese Islands. *Xjenza Online.* 3(2), 153-164.
- Lavin, P., Atala, C., Gallardo-Cerda, J., González-Aravena, M., De la Iglesia, R., Osés, R., Torres-Díaz, C., Trefault, N., Molina-Montenegro, M. A. e Laughinghouse IV, H. D. (2016). Isolation and characterization of an Antarctic *Flavobacterium* strain with agarase and alginate lyase activities. *Pol. Polar Res.* 37 (3), 403-419.
- 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., 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., Santos, O. C. S. e Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10(1), 86-105.
- Li, C., Cheng, M., Zhu, M. e Lyons, T. W. (2018). Heterogeneous and dynamic marine shelf oxygenation and coupled early animal evolution. *Emerg Top. Life Sci.* 2(2), 279-288.
- 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.
- Lomartire, S. e Gonçalves, A. M. (2023). Algal Phycocolloids: Bioactivities and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs.* 21(7), 384.
- Lopes, I. R. (2020). Análise a produção de hidrolases por bactérias associadas à esponja marinha *Plakina cyanorosea* do litoral de Cabo Frio (RJ). Trabalho de Conclusão de Graduação (Graduação em Microbiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Repositório Institucional Pantheon.
- Lopes, I. R., Canellas, A. L. B., de Oliveira, B. F. R. e Laport, M. S. (2023). Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes. *Rev. Biol.* 22(1), 32-46.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H. e Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega.* 8(6), 5184-5196.
- Maldonado M., Zhang X., Cao X., Xue, L., Cao, H. e Zhang, W. (2010). Selective feeding by sponges on pathogenic microbes: a reassessment of potential for abatement of microbial pollution. *Mar. Eco. Prog. Ser.* 403:75-89.
- 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*. *Microbiol.* 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.
- 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.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. e Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock*, 14 eds. (Porto Alegre, Artmed Editora), pp. 151-153.
- Moitinho-Silva, L., Steinert, G., Nielsen, S., Hardoim, C. C. P., Wu, Y., McCormack, G. P., LópezLegentil, S., Marchant, R., Webster, N. e Thomas T. e Hentschel, U. (2017). Predicting the HMA-LMA Status in Marine Sponges by Machine Learning. *Front. Microbiol.* 8.
- Nakamura, L. K. (1987). *Bacillus alginolyticus* sp. nov. and *Bacillus chondroitinus* sp. nov., two alginate-degrading species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37(3): 284-286.
- 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.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S. e Adivarekar, R. (2013). Application of lipase from marine bacteria
- Nunes, S., da Silva Rosa, H., Canellas, A. L. B., Romanos, M. T. V., Dos Santos, K. R., Muricy, G., Oelemann, W.M.R. e Laport, M. S. (2021). High reduction of staphylococcal biofilm by aqueous extract from marine sponge-isolated *Enterobacter* sp. *Res. Microbiol.* 172(1), 103787.
- Panda, T. e Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(2), 160-169
- Peralta-Figueroa, C., Martínez-Oyanedel, J., Bunster, M. e González-Rocha, G. (2021). Purified proteases of two Antarctic bacteria: from screening to characterization. *Antarct. Sci.* 33(6), 633-644.
- Pereira, R.C.S., Gouveia, L.B. e Dinis, M.A.P. (2022). A Educação Ambiental por meio do uso das metodologias ativas: um estudo de caso na cidade de Cabo Frio (RJ). *RevBEA.* 17(2), 153-168.
- 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.
- Punekar, N.S. (2018). Chapter Enzymes: Historical Aspects. In: *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms.* (Springer, Singapore), pp. 5-13.
- 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*. *Enzyme Microb. Tech.* 85, 1-11.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S. e Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol.* 56(1), 16.
- Renard, E., Gazave, E., Fierro-Constain, L., Schenkelaars, Q., Ereskovsky, A.V., Vacelet, J. e Borchiellini, C. (2013). Porifera (Sponges): recent knowledge and new perspectives. In: *eLS.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, pp. 1–9.
- Renard, E., Rocher, C., Ereskovsky, A. e Borchiellini, C. (2021). The homoscleromorph sponge, *Oscarella lobularis*. In: *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology.* CRC Press, pp. 79-100.
- Richardson, K., Hardesty, B.D. e Wilcox, C. (2019). Estimates of fishing gear loss rates at a global scale: A literature review and meta-analysis. *Fish Fish.* 20(6), 1218-1231.
- Rohman, A. F., Atitus, I. N., Heraswati, D. D., Istiqomah, I. e Isnansetyo, A. (2021). Isolation of *Aeromonas sobria* JC18 from milkfish (*Chanos chanos*) intestine with proteolytic and cellulolytic activities for fish probiotic. *IOP Science.* 919 (1), 012055.
- Rosenberg, E. e Zilber-Rosenberg I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome.* 6:1-14.
- Ruiz, C., Villegas-Plazas, M., Thomas, O. P., Junca, H. e Pérez, T. (2020). Specialized microbiome of the cave-dwelling sponge *Plakina kanaky* (Porifera, Homoscleromorpha). *FEMS Microbiol. Ecol.* 96(4), 43.
- Ruocco, N., Costantini, S., Palumbo, F. e Costantini, M. (2017). Marine sponges and bacteria as challenging sources of enzyme inhibitors for pharmacological applications. *Mar. Drugs.* 15(6), 173.
- Samalens, F., Thomas, M., Claverie, M., Castejon, N., Zhang, Y., Pigot, T., Blanc, S. e Fernandes, S. C. (2022).

Progresses and future prospects in biodegradation of marine biopolymers and emerging biopolymer-based materials for sustainable marine ecosystems. *Green Chem.* 24(5), 1762-1779.

Sánchez Hinojosa, V., Asenjo, J. e Leiva, S. (2018). Agarolytic culturable bacteria associated with three antarctic subtidal macroalgae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1-9.

Sanchez, S. e Demain, A. L. (2017). Useful microbial enzymes—an introduction. In: *Biotechnology of microbial enzymes*. Brahmachari, G., ed. (Academic Press), pp. 1-11.

Sankaralingam, S., Palpperumal, S., Harinathan, B., Kathiresan, D., Shankar, T. e Sundarapandian, S. (2018). Screening and characterization of cellulase by *Bacillus megaterium* isolated from marine sediments and its antimicrobial activity. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 17(5), 646-653.

Santos-Gandelman, J.F., Giambiagi-deMarval, M., Oelemann, W.M.R. e Laport, M.S. (2014). Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15, 143-155.

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V. e Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.* 34(1), 5- 28.

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. *Hydrobiol.* 687, 341–351.

Schneider, X. T., Stroil, B. K., Tourapi, C., Rebours, C., Gaudêncio, S. P., Novoveska, L. e Vasquez, M. I. (2022). Responsible research and innovation framework, the Nagoya protocol and other European blue biotechnology strategies and regulations: gaps analysis and recommendations for increased knowledge in the marine biotechnology community. *Mar. Drugs.* 20(5), 290.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. e Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49(4), 543-551.

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.

Singh, R. S., Singh, T. e Pandey, A. (2019). Microbial Enzymes - An Overview. *Adv. Enzym. Technol.* 1–40.

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.

Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D. e Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2): 295–347.

Thomas, F., Barbeyron, T. e Michel, G. (2011). Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR in the marine flavobacterium *Zobellia galactanivorans*. *J. Microbiol. Methods.* 84(1), 61-66.

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: 10/06/2023

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.

Trivedi, N., Reddy, C. R. K. e Lali, A. M. (2016). Marine microbes as a potential source of cellulolytic enzymes. *Ad. Food Nutr.* 79, 27-41.

Trivedi, N., Reddy, C. R. K., Radulovich, R. e Jha, B. (2015). Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Res.* 9, 48- 54.

Turner, E. C. (2021). Possible poriferan body fossils in early Neoproterozoic microbial reefs. *Nature.* 596:87–91.

Uttatree, S. e Charoenpanich, J. (2018). Purification and characterization of a harsh conditions-resistant protease from a new strain of *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Agric. Nat. Resour.* 52(1), 16-23.

- 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.
- 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. (2021). World Porifera Database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2023- 05-14. doi:10.14284/359.
- Vernale, A., Prünster, M. M., Marchianò, F., Debost, H., Brouilly, N., Rocher, C., Massey-Harroche, D., Renard, E., Le Bivic, A., Habermann, B. e Borchiellini, C. (2021). Evolution of mechanisms controlling epithelial morphogenesis across animals: new insights from dissociation-reaggregation experiments in the sponge *Oscarella lobularis*. *BMC Ecol. Evol.* 21(1), 160.
- 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.
- Vogel, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(5), 2069-2071.
- 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.
- Webster, N. S. e Thomas, T. (2016). The Sponge Hologenome. *mBio.* 7(2):e00135-16.
- 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.
- Xue, X., Zhou, Y., Gao, X. e Yan, P. (2019). Advances in application of alginate lyase and its enzymatic hydrolysate. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 612 (2) 022005.
- Zhang, C. e Kim, S. K. (2010). Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs.* 8(6), 1920–1934.
- Zhu, X., Li, X., Shi, H., Zhou, J., Tan, Z., Yuan, M., Yao, P. e Liu, X. (2018). Characterization of a novel alginate lyase from marine bacterium *Vibrio furnissii* H1. *Mar. Drugs.* 16(1), 30.

9 ANEXOS

ANEXO 1: Meios de cultura

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

*Utilizado para as estirpes isoladas no Marine, Marine diluído, Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar ou alginato-liase

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

NaCl.....	2,338%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,493%
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,407%
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,147%
KCl.....	0,075%
NaHCO ₃	0,017%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O deionizada.....	1.000 mL

AGARASE

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

NaCl.....	2,338%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,493%
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,407%
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,147%
KCl.....	0,075%
NaHCO ₃	0,017%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O deionizada.....	1.000 mL

Meio Mineral Mínimo + Ágar 1,5% (m/v)

(Thomas *et al.*, 2011)

NaCl.....	2,47%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,63%
NH ₄ Cl.....	0,2%
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,46%
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,06%
KCl.....	0,07%
NaHCO ₃	0,02%
K ₂ PO ₄	1,5%
Extrato de levedura.....	0,3%
FeSO ₄	0,002%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O.....	1.000 mL

ALGINATO-LIASE

Meio Mineral Mínimo + Ágar 1,5% (m/v) + Alginato de sódio 1,0% (m/v)

(Thomas *et al.*, 2011)

NaCl.....	2,338%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,493%
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,407%
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,147%
KCl.....	0,075%
NaHCO ₃	0,017%
Alginato de sódio.....	1%

Ágar.....1,5%

H₂O deionizada.....1.000 mL

Meio contendo alginato de sódio e azul de bromotimol

(Nakamura, 1987)

Alginato de sódio.....1%

Azul de bromotimol.....0,003%

Peptona.....0,05%

Ágar.....1,5%

H₂O.....1000 mL

AMILASE

LB + Amido 0,2% (m/v)

(Hankin e Anagnostakis, 1975).

*Para bactérias isoladas nos meios BHI e BHI diluído

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

*Para bactérias isoladas de Marine, Marine 1:10, Meio Mineral Mínimo acrescido de ágar ou alginato de sódio

Amido.....1%

Extrato de levedura.....0,4%

Peptona.....0,2%

Ágar.....1,5%

ASW.....1.000 MI

CELULASE

CMC Ágar (Kasana *et al.*, 2008)

NaNO₃.....0,2%

K₂HPO₄..... 0,1%

MgSO ₄	0,05%
KCl.....	0,05%
Peptona.....	0,02%
Carboximetilcelulose.....	0,2%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O.....	1.000 mL

LIPASE/ESTERASE

Meio de Sierra (Sierra, 1957)

Peptona.....	1%
NaCl.....	0,05%
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,01%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O.....	1.000 mL

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).

PEPTIDASE

Skim Milk Agar (Atlas, 1997)

Peptona.....	0,5%
Extrato de levedura.....	0,3%
Leite desnatado em pó.....	0,1%
Ágar.....	1,5%
H ₂ O.....	1.000 mL