



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE BACTÉRIAS
PRESENTES NO LITORAL DO PARANÁ**

LAÍS ANDRÉA RITTER DE AVELAR

Foz do Iguaçu
2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE BACTÉRIAS
PRESENTES NO LITORAL DO PARANÁ**

LAÍS ANDRÉA RITTER DE AVELAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Foz do Iguaçu
2025

LAÍS ANDRÉA RITTER DE AVELAR

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE BACTÉRIAS PRESENTES NO LITORAL DO PARANÁ


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA


Documento assinado digitalmente
 MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI
Data: 02/09/2025 13:04:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

UNILA

Documento assinado digitalmente
 RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS
Data: 02/09/2025 12:57:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli-Santos
UNILA

Documento assinado digitalmente
 NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA
Data: 02/09/2025 10:07:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Nathália Corrêa Chagas de Souza
UNILA

Foz do Iguaçu, 07 de agosto de 2025.

À minha mãe Luiza (*in memoriam*), que me guia diariamente de onde quer que esteja, e ao meu pai Spartaco, que sempre apoiou minhas decisões acadêmicas e priorizou meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), que ao longo dos últimos anos me proporcionou uma formação sólida, plural e crítica. Agradeço não apenas pelo conhecimento técnico repassado em sala de aula, mas também pelo apoio institucional oferecido aos estudantes, que nos permitiu crescer como pessoas e como futuros profissionais éticos e comprometidos com a sociedade.

Agradeço especialmente às minhas grandes amigas, Débora e Maria Eduarda, por caminharem comigo durante essa jornada. O apoio constante, a troca de conhecimentos, os momentos de riso e até os de desespero foram fundamentais para que eu me mantivesse firme até aqui. Nossa amizade, que resiste ao tempo e às mudanças, foi um dos pilares que me sustentou.

À minha psicóloga, minha sincera gratidão por ter sido um ponto de equilíbrio em meio ao caos. Seu acolhimento e profissionalismo foram essenciais para que eu encontrasse força em mim mesma, mesmo diante dos períodos mais turbulentos da minha vida pessoal. Obrigada por me ajudar a seguir em frente.

À minha tia Aline, que é como uma segunda mãe, deixo meu carinho e reconhecimento. Sua presença constante, seu incentivo e sua generosidade foram indispensáveis para que eu nunca me sentisse sozinha nessa caminhada. Obrigada por nunca soltar minha mão.

À minha mãe, Luiza, que partiu cedo demais, mas deixou em mim uma força que carrego todos os dias. Mesmo não estando fisicamente presente, sua memória me acompanha e me inspira em cada conquista. Crescer sem você ao meu lado foi um dos maiores desafios da minha vida, mas a lembrança do seu amor, do seu carinho e do seu cuidado me guiou silenciosamente em cada etapa do caminho. Este trabalho, esta vitória, também é sua. Obrigada por tudo que me ensinou, mesmo em tão pouco tempo.

E, por fim, agradeço à pessoa mais importante da minha vida: meu pai. Nada do que escrevo será suficiente para expressar o quanto sou grata por tudo que ele representa para mim. Seu amor, paciência, apoio incondicional e confiança em mim,

mesmo quando minhas ideias pareciam um pouco malucas, foram combustíveis fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ser meu porto seguro, meu maior incentivador e meu exemplo de força.

*Será que às vezes te enlouquece a
rapidez com que a noite muda?*

One Direction

RESUMO

Os ambientes marinhos representam uma rica fonte para a obtenção de microrganismos produtores de uma grande variedade de enzimas e produtos naturais de interesse industrial, os quais apresentam a vantagem de serem geralmente mais estáveis e ativos em condições extremas de salinidade, temperatura e pressão, características importantes para aplicações industriais. Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias de amostras marinhas coletadas no litoral do Paraná e realizar triagens enzimáticas para identificar linhagens com potencial biotecnológico. Foram utilizadas amostras de esponja, alga e briozoário coletadas na Ilha do Mel e no Pontal do Paraná. As bactérias foram isoladas em meio contendo água do mar e substrato marinho, totalizando 16 linhagens. Essas linhagens foram submetidas a testes qualitativos para detectar a produção de celulasas, amilases e proteases em meios sólidos específicos. Foi possível observar que doze isolados apresentaram atividade enzimática, sendo seis positivos para celulase, seis para protease e dez para amilase. Três isolados destacaram-se por produzirem as três enzimas analisadas. Observou-se que alterações na coloração dos meios podem estar relacionadas à produção de metabólitos secundários e acidificação do meio. Quatro isolados do briozoário não cresceram em meios seletivos, sugerindo exigências nutricionais específicas. Dentre os três tipos de amostras avaliadas, as esponjas marinhas apresentaram maior diversidade e atividade enzimática, reforçando seu potencial como fonte de microrganismos de interesse biotecnológico. Desta forma, os resultados obtidos ressaltam a importância da exploração de microrganismos marinhos como fontes promissoras de enzimas industriais, bem como a necessidade de preservação dos ambientes marinhos e de seu estudo, visto que ainda são pouco explorados, apesar de seu enorme potencial biotecnológico.

Palavras-chave: bactérias marinhas; triagem enzimática; celulase; amilase; protease.

RESUMEN

Los ambientes marinos representan una rica fuente para la obtención de microorganismos productores de una gran variedad de enzimas y productos naturales de interés industrial, los cuales presentan la ventaja de ser generalmente más estables y activos en condiciones extremas de salinidad, temperatura y presión, características importantes para aplicaciones industriales. Este trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias de muestras marinas recolectadas en el litoral del Paraná y realizar triajes enzimáticos para identificar linajes con potencial biotecnológico. Se utilizaron muestras de esponja, alga y briozoo colectadas en la Ilha do Mel y en el Pontal do Paraná. Las bacterias fueron aisladas en un medio que contenía agua de mar y sustrato marino, totalizando 16 linajes. Esos linajes fueron sometidos a pruebas cualitativas para detectar la producción de celulasas, amilasas y proteasas en medios sólidos específicos. Fue posible observar que doce aislados presentaron actividad enzimática, siendo seis positivos para celulasa, seis para proteasa y diez para amilasa. Tres aislados se destacaron por producir las tres enzimas analizadas. Se observó que las alteraciones en la coloración de los medios pueden estar relacionadas con la producción de metabolitos secundarios y la acidificación del medio. Cuatro aislados del briozoo no crecieron en medios selectivos, sugiriendo exigencias nutricionales específicas. Dentro de los tres tipos de muestras evaluadas, las esponjas marinas presentaron mayor diversidad y actividad enzimática, reforzando su potencial como fuente de microorganismos de interés biotecnológico. De esta forma, los resultados obtenidos resaltan la importancia de la exploración de microorganismos marinos como fuentes prometedoras de enzimas industriales, así como la necesidad de preservación de los ambientes marinos y de su estudio, ya que aún son poco explorados a pesar de su enorme potencial biotecnológico.

Palabras clave: bacterias marinas; cribado enzimático; celulasa; amilasa; proteasa.

ABSTRACT

Marine environments represent a rich source for obtaining microorganisms that produce a great variety of enzymes and natural products of industrial interest, which have the advantage of being generally more stable and active under extreme conditions of salinity, temperature, and pressure, important features for industrial applications. This study aimed to isolate bacteria from marine samples collected on the coast of Paraná and conduct enzymatic screenings to identify strains with biotechnological potential. Samples of sponge, algae, and bryozoan were used, collected at Ilha do Mel and Pontal do Paraná. The bacteria were isolated in media containing seawater and a marine substrate, totaling 16 strains. These strains were subjected to qualitative tests to detect the production of cellulases, amylases, and proteases in specific solid media. It was possible to observe that twelve isolates showed enzymatic activity, with six positive for cellulase, six for protease, and ten for amylase. Three isolates stood out for producing all three enzymes analyzed. It was observed that color changes in the media may be related to the production of secondary metabolites and the acidification of the medium. Four bryozoan isolates did not grow in selective media, suggesting specific nutritional requirements. Among the three types of samples evaluated, marine sponges showed greater diversity and enzymatic activity, reinforcing their potential as a source of microorganisms of biotechnological interest. Thus, the results obtained highlight the importance of exploring marine microorganisms as promising sources of industrial enzymes, as well as the need for the preservation of marine environments and their study, as they are still little explored despite their enormous biotechnological potential.

Key words: marine bacteria; enzymatic screening; cellulase; amylase; protease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras de esponja, alga e briozoário coletadas na Ilha do Mel e no Pontal do Paraná.....	22
Figura 2 - Mapa da Ilha do Mel	22
Figura 3 - Mapa do Município de Pontal do Paraná.....	23
Figura 4 - Rocha com organismos marinhos	24
Figura 5 - Bactérias isoladas.....	27
Figura 6 - Placas contendo meio CMC	29
Figura 7 - Comparação das placas contendo leite desnatado	30
Figura 8 - Comparação das placas contendo amido após a adição de lugol 1%.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de microrganismos marinhos, enzimas produzidas e suas aplicações	20
Tabela 2- Linhagens bacterianas isoladas das amostras marinhas	26
Tabela 3 - Resultado das atividades enzimáticas.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO	16
2.1 MICRORGANISMOS MARINHOS.....	16
2.1.1 <i>Principais grupos bacterianos recuperados do ambiente marinho</i>	<i>16</i>
2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS MARINHAS.....	17
2.2.1 <i>Bioprospecção.....</i>	<i>17</i>
2.2.2 <i>Biorremediação.....</i>	<i>18</i>
2.3 INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS MARINHAS	22
4.2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS	23
4.3 EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
4.3.1 <i>Celulase.....</i>	<i>24</i>
4.3.2 <i>Amilase.....</i>	<i>24</i>
4.3.3 <i>Protease</i>	<i>25</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 ISOLAMENTO	26
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	27
5.2.1 <i>Isolados com Origem Comum e Ausência de Crescimento.....</i>	<i>32</i>
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Oceanos e mares cobrem aproximadamente 70% da superfície da Terra, desempenham um papel crucial na regulação do clima global e fornecem metade do oxigênio atmosférico (BOLLMANN *et al.* 2010). Microrganismos marinhos, são a base de uma enorme diversidade de processos vitais nos oceanos. Desempenhando papéis essenciais na reciclagem de nutrientes e na cadeia alimentar, esses organismos unicelulares também são cruciais para a saúde dos ecossistemas marinhos e do planeta como um todo. Eles incluem bactérias, archaea, fungos, algas microscópicas além de vírus, todos adaptados a ambientes marinhos muitas vezes extremos, com elevada salinidade, áreas de alta pressão e baixa disponibilidade de nutrientes. Ou seja, os organismos marinhos têm notável resistência em ambientes adversos (POTUMARTHI *et al.* 2007).

Os ambientes marinhos representam a fonte mais rica de novos genes, enzimas e produtos naturais para uso em processos industriais. Em particular, as espécies microbianas que vivem em condições extremas são uma fonte natural extraordinária de enzimas estáveis e eficientes, que podem melhorar o desempenho e a sustentabilidade dos processos industriais por serem geralmente mais estáveis e ativos em condições extremas de salinidade, temperatura e pressão, características importantes para aplicações industriais. disponibilizando novos processos para o futuro, tornando as aplicações e produtos biotecnológicos mais econômicos e ecológicos (POLI *et al.* 2017). Com habilidades que vão desde a produção de enzimas únicas até a degradação de poluentes, como hidrocarbonetos e plásticos, eles oferecem soluções para alguns dos problemas mais prementes enfrentados pela sociedade moderna. A busca por novas aplicações baseadas nesses microrganismos, um campo conhecido como bioprospecção, tem levado a descobertas inovadoras que impactam setores como o industrial, o farmacêutico e o ambiental.

Este estudo explorou o potencial dos microrganismos marinhos, concentrando-se em bactérias isoladas destes ambientes. A pesquisa focou no isolamento de bactérias e na triagem enzimática para selecionar linhagens com potenciais biotecnológicos, entre eles a capacidade de produzir enzimas de interesse industrial, como amilases, proteases e celulasas. Com o aumento do interesse em alternativas sustentáveis, é fundamental compreender e explorar o potencial dos microrganismos

marinhos como parte essencial para lidar com questões ambientais globais e aprimorar procedimentos industriais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MICRORGANISMOS MARINHOS

Microrganismos marinhos são organismos unicelulares microscópicos que desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas marinhos. Eles incluem bactérias, archaea, fungos e algas microscópicas além de vírus. Os habitats microbianos dentro dos ecossistemas marinhos exibem uma especialização notável e enfrentam condições desafiadoras devido a fatores como variações de pH, eventos de precipitação, gradientes de salinidade, dinâmicas do vento, variações de temperatura, correntes oceânicas e concentrações elevadas de metais pesados na água do mar, que podem exercer efeitos deletérios sobre sua sobrevivência (ALABSSAWY; HASHEM, 2024). Eles são encontrados em grande abundância, assim, a biodiversidade do oceano representa 50% da total biodiversidade do planeta Terra, tornando os microrganismos marinhos uma fonte sustentável de novos compostos bioativos (AMEEN *et al.*, 2021). Eles são capazes de produzir enzimas únicas, mais estáveis e ativas em comparação com organismos terrestres, graças a sua adaptação a ambientes diferenciados (BIROLLI *et al.*, 2019). Os microrganismos marinhos formam a base das cadeias alimentares marinhas e são responsáveis por processos essenciais, como a reciclagem de nutrientes e a regulação do clima global. Essa diversidade microbiana tem sido explorada para aplicações biotecnológicas, como a produção de biomoléculas e enzimas com potencial industrial (MOU *et al.*, 2022).

2.1.1 Principais grupos bacterianos recuperados do ambiente marinho

Diversos gêneros bacterianos têm sido isolados do ambiente marinho. Entre os mais recorrentes estão: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e, em destaque, o gênero *Streptomyces*, conhecido por sua capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos (AMEEN *et al.*, 2021).

Essas bactérias possuem propriedades fisiológicas e bioquímicas diferentes de suas equivalentes terrestres e, por isso, produzem compostos com potenciais aplicações terapêuticas e industriais. Por exemplo, bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de ambientes marinhos demonstraram atividade antimicrobiana contra cepas patogênicas, e *Streptomyces* marinhos têm sido fontes de compostos antitumorais e

antiproliferativos (AMEEN *et al.*, 2021).

Além disso, gêneros como *Halomonas*, *Shewanella*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e *Mycobacterium* foram descritos em biotransformações enzimáticas complexas e biodegradação de compostos orgânicos persistentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BIROLLI *et al.*, 2019).

Esses microrganismos têm demonstrado capacidades únicas, como tolerância a altas concentrações de sal, variações de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos. Enzimas derivadas dessas bactérias apresentam atividade mesmo em condições extremas, o que as torna valiosas para bioprocessos industriais e ambientais (MOU *et al.*, 2022).

2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS MARINHAS

2.2.1 Bioprospecção

A bioprospecção de bactérias marinhas envolve uma busca sistemática por produtos úteis e valiosos, como genes, proteínas e metabólitos secundários, desses microrganismos que podem beneficiar a sociedade (PARDO-LÓPEZ, 2019).

Não raramente, para realizá-la, os pesquisadores voltam suas atenções para ambientes peculiares, onde uma adaptação extrema de sua biota é esperada, como desertos, fontes termais, florestas, águas ou solos contaminados ou com características singulares como alcalinidade ou acidez, entre outros (ASTOLFI, S.; SILVA, C.; BIGI, M., 2015).

Essa abordagem visa explorar a diversidade biológica dos microrganismos marinhos em busca de compostos bioativos com potencial aplicação em diversos setores, como biorremediação, indústria farmacêutica, cosméticos e alimentos. A bioprospecção de bactérias marinhas tem sido essencial para a descoberta de novas enzimas degradadoras de hidrocarbonetos, biossurfactantes e bioemulsificantes, que desempenham um papel crucial na remediação de ambientes contaminados. A capacidade dos microrganismos de produzir enzimas extracelulares está homoganeamente distribuída, mas a extensão em que as capacidades enzimáticas variam entre comunidades microbianas inteiras nos oceanos precisa ser amplamente explorada (DE SANTI, 2015). O potencial biotecnológico das bactérias marinhas se estende desde a degradação de poluentes ambientais até a produção de compostos

bioativos com aplicações em diversos setores industriais, destacando sua importância na busca por soluções sustentáveis para problemas ambientais globais.

2.2.2 Biorremediação

Os microrganismos marinhos, especialmente as bactérias, têm um papel crucial na biorremediação de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos e plásticos, devido à sua capacidade de degradação destes poluentes e à produção de compostos bioativos, como surfactantes e emulsificantes. Os microrganismos demonstraram uma eficácia notável na remediação de poluentes ambientais (AHMED *et al.*, 2022; FOU DA *et al.*, 2015). Sua capacidade de crescer rapidamente e serem facilmente manipulados os torna inestimáveis nesse campo (HASH EM *et al.*, 2020). A capacidade de degradação de hidrocarbonetos por essas bactérias marinhas é essencial para a remediação de derramamentos de petróleo no mar profundo, destacando a importância da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. A identificação e isolamento dessas bactérias é realizada através de técnicas como a inoculação de amostras de água do mar ou sedimentos (YAKIMOV *et al.*, 2007; KOSTKA *et al.*, 2011; HAZEN *et al.*, 2010).

A pesquisa nesse campo tem se concentrado em otimizar as tecnologias de biorremediação, explorando a diversidade bacteriana marinha e seus potenciais aplicações na resolução de problemas ambientais globais. As bactérias marinhas possuem mecanismos molecularmente complexos para degradar hidrocarbonetos em ambientes marinhos desafiadores, o que as torna valiosas na remediação de derramamentos de petróleo e na limpeza de ambientes poluídos. Também são uma fonte promissora de enzimas capazes de degradar plásticos sintéticos, como o PET, apresentando potencial para a biodegradação de resíduos plásticos e a redução da poluição por plásticos no ambiente marinho. A produção de biosurfactantes por bactérias marinhas também oferece alternativas naturais e ecologicamente corretas aos surfactantes sintéticos, com aplicações em biorremediação, indústria farmacêutica, cosméticos e alimentos. Portanto, as bactérias marinhas continuam sendo uma fonte potencial de ferramentas biotecnológicas ainda não descobertas que poderiam ser usadas para resolver preocupações globais atuais, como a poluição por petróleo e plástico (MURIEL-MILLÁN; MILLÁN-LÓPEZ; PARDO-LÓPEZ, 2021).

Linhagens de bactérias marinhas produzem enzimas e metabólitos úteis na biorremediação. *Alcanivorax borkumensis* SK2 é especializada na degradação de

hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes que facilitam a emulsificação do óleo (CUI *et al.*, 2022). Já *Rhodococcus ruber* forma biofilmes sobre plásticos como o polietileno e é capaz de mineralizá-los parcialmente, com evidência de degradação em ambiente marinho (GOUDRIAAN *et al.*, 2023). Essas bactérias representam alternativas sustentáveis para combater a poluição por petróleo e plásticos nos oceanos.

2.3 INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA

Os microrganismos são capazes de fornecer números impressionantes de biocatalisadores com uma ampla gama de aplicações em diversos setores, como alimentos, ração animal, detergentes, biocombustíveis, produtos químicos finos e farmacêuticos (TRINCONE, 2010). Além disso, esses biocatalisadores apresentam propriedades bioquímicas únicas, como a halotolerância (capacidade de suportar uma condição considerada, teoricamente, desfavorável), extremos de pH, temperatura e barofilicidade (capacidade do microrganismo de se adaptar a altas pressões), que os tornam atraentes para uso em diversos setores industriais.

Pesquisas científicas demonstraram que bactérias marinhas são capazes de produzir uma ampla variedade de enzimas industriais. As enzimas industriais derivadas de bactérias marinhas incluem α -amilase, α -glicosidase, agarase, α -galactosidase, celulasas, quitinase, lipase e protease (CHENG, 2020).

As celulasas são enzimas induzíveis que são sintetizadas por microrganismos durante seu crescimento em materiais celulósicos (LEE & KOO, 2001). Recentemente, o potencial das celulasas foi revelado em várias indústrias, como alimentos, têxteis e lavanderia, celulose e papel, agricultura, bem como pesquisa e desenvolvimento (BHARDWAJ *et al.*, 2021).

Microrganismos produtores de α -amilase de diferentes habitats marinhos já foram relatados anteriormente. Isso é de grande importância do ponto de vista de aplicações tecnológicas em uma variedade de indústrias, incluindo processamento de alimentos, cervejarias, papel, medicamentos e açúcar (GOEL, 2022). São encontrados diferentes gêneros de arqueias e bactérias extremófilas marinhas, desde a superfície até regiões profundas do oceano, incluindo *Desulfurococcus* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pyrococcus* sp., *Rhodothermus* sp. e *Thermococcus* sp. (DALMASO, 2015).

As proteases são grupos complexos de enzimas distinguíveis pelo seu local de clivagem, sítio ativo catalítico e pH ideal (BARZKAR, 2018). Elas são principalmente utilizadas na indústria para a hidrólise de proteínas, preparação de

compostos orgânicos e nas áreas de alimentos, detergentes, recuperação de prata, produtos farmacêuticos, couro e têxteis (SRINIVASAN & RELE, 1999). Algumas bactérias encontradas em ambiente marinho produtoras de protease são dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Pseudoalteromonas*, que são os mais dominantes (SU *et al.*, 2020).

A diversidade de microrganismos marinhos e a variedade de enzimas que produzem refletem seu potencial biotecnológico para aplicações industriais. A Tabela 1 ilustra alguns exemplos de espécies bacterianas marinhas isoladas, juntamente com as enzimas produzidas por esses microrganismos e suas respectivas aplicações industriais, evidenciando a diversidade funcional desses organismos.

Tabela 1- Exemplos de microrganismos marinhos, enzimas produzidas e suas aplicações

Local de coleta	Espécie isolada	Enzima	Aplicação industrial	Referência
Mar Vermelho	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Celulase	Produção de açúcares a partir de celulose	Fatani, 2021
Sedimentos da Baía de Prydz (Antártica)	<i>Nocardiopsis</i> sp. 7326	Amilase	Utilizado como aditivo detergente, como agente de descolagem no processamento têxtil e na indústria alimentícia	Zhang, 2007
Beagle Channel (Argentina)	<i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alteromonas</i> spp.	Protease	Produção de protease ativa em baixas temperaturas e pH variado; ideal para biorremediação em frio	Cristóbal, 2011

Fonte: A autora, 2025.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o isolamento e a triagem enzimática em bactérias recuperadas de amostras marinhas, visando selecionar linhagens com potencial biotecnológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o isolamento de bactérias presentes nas amostras marinhas (alga, esponja e briozoário) coletadas no litoral do estado do Paraná.

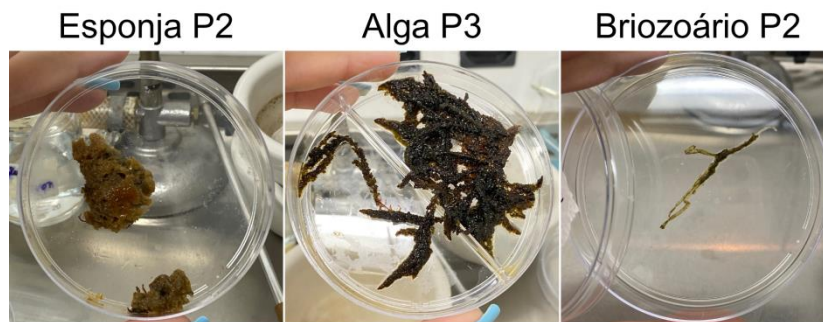
Testar a capacidade das bactérias isoladas em produzir enzimas de interesse biotecnológico, como celulases, amilases e proteases.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS MARINHAS

As amostras marinhas incluindo algas, esponja e briozoário (Figura 1) foram coletadas na região da Ilha do Mel (Figura 2) e na região do Pontal do Paraná (Figura 3), no litoral do estado do Paraná, em janeiro de 2024. As amostras foram coletadas utilizando tubos tipo Falcon de 50 mL esterilizados. Após coleta, as amostras foram acondicionadas a 4°C, sendo processadas no laboratório de Biotecnologia Ambiental da Unila.

Figura 1 - Amostras de esponja, alga e briozoário coletadas na Ilha do Mel e no Pontal do Paraná.



Legenda: esponja P2 e Briozoário P2 foram coletados no Pontal do Paraná e a Alga P3 foi coletada na Ilha do Mel. P2 e P3= pontos de coleta. Fonte: A autora, 2024.

Figura 2 - Mapa da Ilha do Mel



Fonte: Google Maps, 2024.

Figura 3 - Mapa do Município de Pontal do Paraná

Fonte: Google Maps, 2024

4.2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As amostras foram trituradas com o auxílio de um almofariz e um pistilo esterilizados. O almofariz e o pistilo foram bem lavados com água e detergente e, após secarem, foi passado álcool 70% em cada um. Eles foram então embrulhados em papel pardo e deixados 48h em uma estufa a 100°C. Os extratos foram processados realizando diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) em água destilada esterilizada, totalizando 10 mL na última diluição. Alíquotas de 50 μ L deste processado foram semeadas no meio de cultura Nutriente Ágar (NA) (composição: extrato de carne 3 g/L; peptona 5 g/L; ágar 15 g/L). Os meios NA foram preparados utilizando água do mar e 50 ml/L de um substrato marinho preparado de um raspado de um material orgânico (esponja, craca, entre outros organismos marinhos), crescido em uma pedra (Figura 4), coletada no dia da coleta. Os meios continham 50 μ L nistatina (100.000 U L^{-1}), por placa, um antifúngico para prevenir o crescimento de fungos nas placas. As placas foram mantidas na estufa a 37°C até o aparecimento das colônias bacterianas, não houve testes em outras temperaturas. Foram isoladas linhagens bacterianas distintas, a partir da sua diversidade de cores e tamanho. As bactérias isoladas também foram preservadas a -80 °C, em glicerol a 20%.

Figura 4 - Rocha com organismos marinhos



Fonte: Michel Passarini, 2024.

4.3 EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Celulase

A avaliação da triagem qualitativa da atividade da enzima celulase foi realizada de acordo com Bernal *et al.* (2021). Placas de Petri foram preparadas com o meio de cultivo contendo: 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), 0,6 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de sulfato de amônio, 0,5 g/L de nitrato de sódio, 1 g/L de fosfato monobásico de potássio, 1 g/L de fosfato dibásico de potássio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,02 g/L de cloreto de cálcio e 15 g/L de ágar. Os isolados bacterianos previamente crescidos em meio de cultivo NA, foram cultivados nos meios contendo CMC através de estrias de esgotamento a 37 °C por cinco dias. Após o crescimento, 5 mL de solução de vermelho Congo (2,5 g/L) foram adicionados ao meio e mantidos por 15 minutos, seguidos por lavagem com solução de NaCl 1 M. A formação de halo de descoloração ao redor da colônia foi considerada indicativo positivo de atividade enzimática. O teste foi realizado em triplicata.

4.3.2 Amilase

A avaliação da triagem qualitativa da atividade da enzima amilase foi realizada de acordo com Bernal *et al.* (2021). As bactérias foram cultivadas em meio

Amido Nutriente Ágar (ANA) contendo 1% de amido solúvel, 5 g/L de glicose e 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. Após esse tempo, uma solução de 1% de iodo e 1% de iodeto de potássio foi adicionada aos meios e a formação de um halo claro em volta das bactérias indicou resultado positivo para a atividade de amilase. O teste foi realizado em triplicata.

4.3.3 Protease

A avaliação da triagem qualitativa da atividade da enzima protease foi realizada de acordo com Souza (2015). As bactérias foram cultivadas no meio NA com 10% de leite desnatado fervido. As placas foram incubadas a 37°C por até 7 dias. Um halo claro em volta das bactérias indicou resultado positivo para a atividade e protease. O teste foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO

Foram isoladas 16 bactérias de morfologias distintas, sendo nove isoladas da amostra de esponja marinha, 6 isoladas da amostra de briozoário, ambas coletadas no Pontal do Paraná. Apenas 1 bactéria foi isolada da amostra de alga coletada na Ilha do Mel (Tabela 2). A figura 5 ilustra a morfologia de alguns isolados recuperados das amostras e preservados em ultracongelamento.

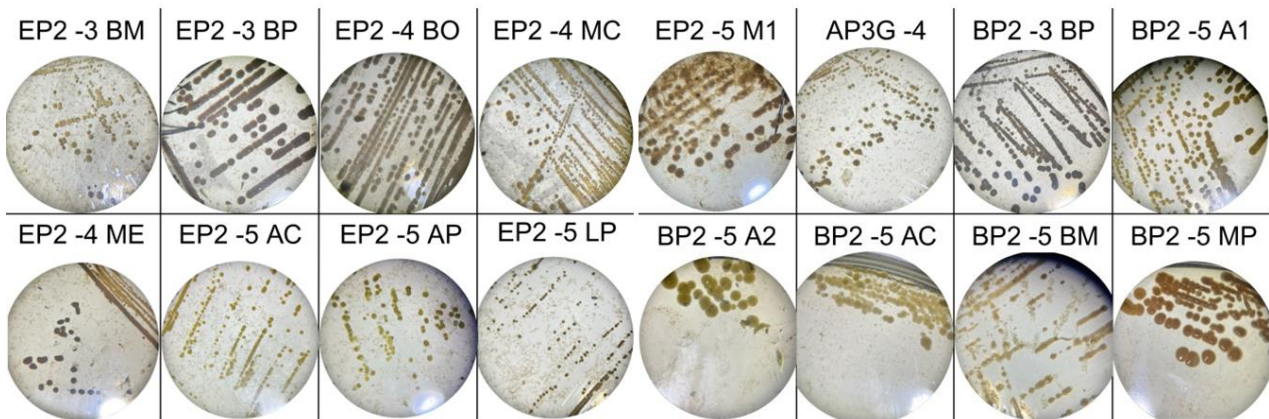
Tabela 2- Linhagens bacterianas isoladas das amostras marinhas

Amostras	Isolados	Significado	*Características das colônias
Esponja P2	EP2 -3 BM	Esponja P2 Branca Maior; diluição 10^{-3}	Cor branca, circular com uma borda regular, colônias maiores
	EP2 -3 BP	Esponja P2 Branca Pequena; diluição 10^{-3}	Cor branca, circular com uma borda regular, colônias pequenas
	EP2 -4 BO	Esponja P2 Branca Opaca; diluição 10^{-4}	Cor branca mais puxada para um bege, circular com borda regular
	EP2 -4 MC	Esponja P2 Marrom Claro; diluição 10^{-4}	Cor marrom claro, circular com uma borda regular
	EP2 -4 ME	Esponja P2 Marrom Escuro; diluição 10^{-4}	Cor marrom escuro, circular com uma borda regular
	EP2 -5 AC	Esponja P2 Amarela Clara; diluição 10^{-5}	Cor amarela clara, circular com uma borda regular
	EP2 -5 AP	Esponja P2 Amarela Pequena; diluição 10^{-5}	Cor amarela, circular com uma borda regular, colônias pequenas
	EP2 -5 M1	Esponja P2 Marrom 1; diluição 10^{-5}	Cor marrom, algumas circulares e outras irregulares
	EP2 -5 LP	Esponja P2 Laranja Pequena; diluição 10^{-5}	Cor laranja, circular com a borda regular, colônias pequenas
BriozoárioP2	BP2 -3 BP	Briozoário P2 Branca Pequena; diluição 10^{-3}	Cor branca, circular com uma borda regular
	BP2 -5 A1	Briozoário P2 Amarela 1; diluição 10^{-5}	Cor amarela, circular com uma borda regular, colônias pequenas

	BP2 -5 A2	Briozoário P2 Amarela 2; diluição 10 ⁻⁵	Cor amarela, circular com uma borda regular, colônias grandes
	BP2 -5 AC	Briozoário P2 Amarela Clara; diluição 10 ⁻⁵	Cor amarela clara, circular com uma borda regular
	BP2 -5 BM	Briozoário P2 Branca Maior; diluição 10 ⁻⁵	Cor marrom claro, circular com uma borda regular
	BP2 -5 MP	Briozoário P2 Marrom Pequena; diluição 10 ⁻⁵	Cor marrom escuro com bordas brancas, circular com bordas regulares
Alga P3	AP3G -4	Alga P3 Grande; diluição 10 ⁻⁴	Cor bege, circular com a borda regular

*De acordo com o crescimento no meio NA com água do mar e material orgânico. Fonte: A autora, 2025.

Figura 5 - Bactérias isoladas



Fonte: A autora, 2025.

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As 16 linhagens bacterianas isoladas das amostras marinhas, foram submetidas e ensaios qualitativos em meios de cultivos sólidos, para seleção da capacidade de produção das enzimas celulase, protease e amilase (tabela 3, figuras 6,7 e 8).

Tabela 3 - Resultado das atividades enzimáticas

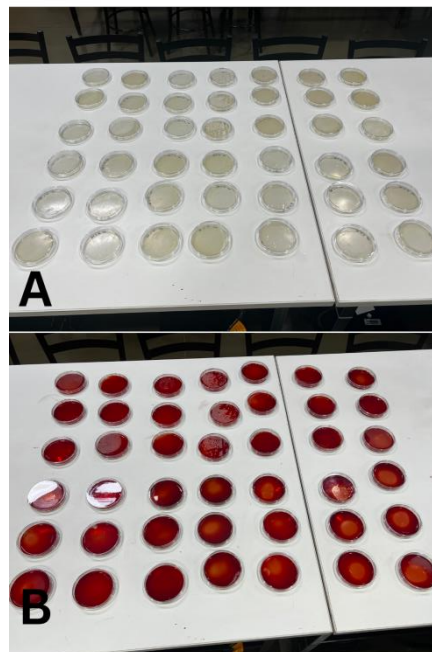
Isolados	Halo de hidrólise Celulase	Halo de hidrólise Protease	Halo de hidrólise Amilase
----------	-------------------------------	-------------------------------	------------------------------

EP2 -3 BM	-	+	+
EP2 -3 BP	-	-	+
EP2 -4 BO	-	-	+
EP2 -4 MC	-	+	+
EP2 -4 ME	+	+	+
EP2 -5 AC	+	-	+
EP2 -5 AP	+	+	+
EP2 -5 M1	+	+	+
EP2 -5 LP	*	+	+
BP2 -3 BP	+	-	+
BP2 -5 A1	-	*	*
BP2 -5 A2	-	*	*
BP2 -5 AC	-	*	*
BP2 -5 BM	+	-	+
BP2 -5 MP	-	*	*
AP3G -4	*	+	+

+ = Atividade enzimática discreta; - = Sem atividade enzimática; * = Não houve crescimento nas placas; Negrito = representa os 3 melhores isolados produtores de enzimas. Fonte: A autora, 2025.

A triagem enzimática realizada evidenciou a capacidade de alguns isolados bacterianos marinhos produzirem enzimas hidrolíticas como celulases, proteases e amilases, que são de grande interesse biotecnológico por estarem envolvidas na degradação de polímeros naturais. Essas enzimas são amplamente aplicadas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis e de biocombustíveis (TRINCONE, 2018), além de desempenharem papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos marinhos.

Figura 6 - Placas contendo meio CMC



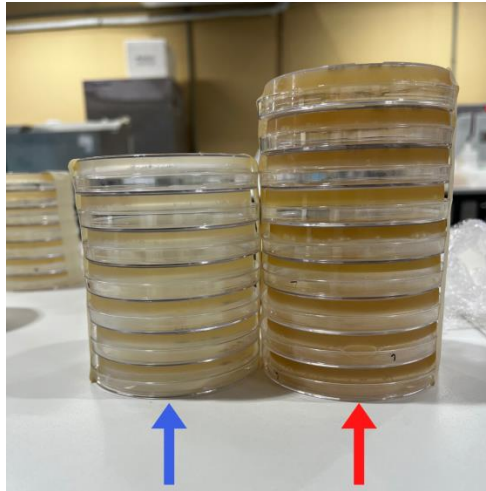
Na figura 7A estão as placas contendo carboximetilcelulose (CMC) antes da adição da solução de vermelho congo. Na figura 7B é possível observar as placas após a adição da solução de vermelho congo. Fonte: A autora, 2025.

Foi possível observar atividades enzimáticas em 12 linhagens bacterianas, de um total de 16 analisadas, representando 75% das bactérias recuperadas das amostras marinhas. No total, 6, 6 e 10 isolados foram capazes de sintetizar em meio sólido, as enzimas celulase, amilase e protease, respectivamente, através da hidrólise dos substratos, CMC, amido e proteína do leite. Três isolados apresentaram os melhores resultados devido a produção das três enzimas testadas, sendo eles EP2 -4 ME, EP2 -5 AP e EP2 -5 M1, ambas bactérias isoladas da amostra de esponja, seguido de 5 isolados também recuperados da amostra da esponja marinha, 2 isolados da amostra de briozoário, e 1 isolado da amostra de alga, os quais foram capazes de sintetizar duas, das três enzimas avaliadas (Tabela 3).

A produção de celulase foi avaliada por meio da formação de halos de hidrólise nas placas contendo carboximetilcelulose (CMC), após a revelação com solução de vermelho congo. Os halos claros ao redor das colônias indicaram a hidrólise do substrato, confirmando a atividade celulolítica. No total, 6 isolados das amostras do Pontal do Paraná obtiveram um resultado positivo para a atividade celulolítica e 8 isolados

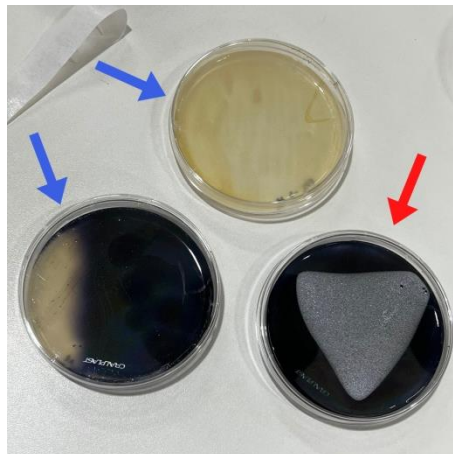
apresentaram um resultado negativo, enquanto 1 isolado do Pontal do Paraná e 1 isolado da Ilha do Mel não apresentaram nenhum crescimento nas placas.

Figura 7 - Comparação das placas contendo leite desnatado



A seta azul aponta para os meios em que não houve alteração da coloração enquanto a seta vermelha aponta para os meios que tiveram alteração da coloração, que foi considerada como resultado positivo para a atividade enzimática. Fonte: A autora, 2025.

Figura 8 - Comparação das placas contendo amido após a adição de lugol 1%



As setas azuis indicam os meios que foram considerados positivos para atividade enzimática enquanto a seta vermelha indica o meio que foi considerado negativo para a atividade enzimática. Fonte: A autora, 2025.

Nos ensaios de protease e amilase, a ausência de halos de lise ou clareamento evidente exigiu a adoção de outros critérios para a avaliação da atividade enzimática. No caso da protease, o meio de cultura foi suplementado com leite,

fornecendo caseína como substrato proteico e a digestão da caseína normalmente leva à formação de zonas claras ao redor das colônias (Bahatkar, 2022). Contudo, nesta triagem, observou-se que em alguns isolados a coloração do meio tornou-se mais escura após o crescimento bacteriano, em contraste com a coloração originalmente esbranquiçada do meio. Essa alteração foi interpretada como indicativo da produção de proteases, considerando que a atividade proteolítica pode ser detectada por diferentes manifestações, e que a expressão enzimática pode variar conforme a cepa e as condições do ensaio (GARCIA *et al.*, 2002).

Para a amilase, a metodologia envolveu o uso de amido como substrato, cuja presença é visualmente revelada por meio da adição de uma solução de iodo a 1% e iodeto de potássio a 1% (Iugol). Essa solução confere ao meio uma coloração azul-escura pela interação do iodo com o amido não degradado (GOPINATH *et al.*, 2017). No entanto, após a adição do Iugol, o meio, que inicialmente adquiriu uma coloração azul-escura devido à interação do iodo com o amido não degradado, apresentou uma descoloração completa em algumas placas. Essa perda total da coloração azul foi considerada um indicativo positivo da presença de atividade amilolítica, sugerindo que o amido disponível no meio foi completamente degradado pelas enzimas produzidas pelos isolados. A ausência de um halo definido pode ser atribuída a uma hidrólise mais difusa e intensa, que resultou na degradação total do substrato na região ao redor e sob a colônia, sem deixar amido residual para interagir com o iodo.

A alteração da coloração dos meios, particularmente os enriquecidos com leite, pode estar associada não apenas à atividade enzimática, mas também à produção de metabólitos secundários. Microrganismos marinhos frequentemente produzem pigmentos, ácidos orgânicos e outros compostos bioativos durante seu crescimento (MALDONADO-RUIZ, 2024), o que pode interferir na coloração do meio de cultura. Essa produção é muitas vezes uma resposta às condições ambientais ou ao substrato disponível, podendo inclusive mascarar ou simular reações enzimáticas. A acidificação do meio é um fenômeno comum nesses casos, resultante da liberação de ácidos orgânicos como lactato, acetato ou succinato, e pode provocar mudanças significativas no pH local, afetando inclusive a solubilidade de alguns componentes do meio (SÁNCHEZ-CLEMENTE, 2018). Esse fator pode ter contribuído para a descoloração observada, especialmente nos casos em que o halo clássico não foi formado.

A acidificação pode inibir ou potencializar a atividade de determinadas enzimas, o que pode ser uma variável importante a ser controlada em futuras análises. A mensuração direta do pH das placas ao final do experimento poderia contribuir para entender melhor esse fenômeno, uma vez que pequenas variações no pH são capazes de alterar significativamente a conformação da enzima e, conseqüentemente, sua eficiência catalítica (GU, 2024).

5.2.1 Isolados com Origem Comum e Ausência de Crescimento

Um achado interessante foi a ausência de crescimento de quatro isolados provenientes do briozoário nos meios contendo amido e leite, embora tenham apresentado crescimento normal no meio de isolamento inicial (NA + água do mar + substrato marinho). Isso sugere que microrganismos com origem semelhante podem ter exigências nutricionais específicas ou sensibilidade a componentes presentes nos meios seletivos utilizados para os testes enzimáticos.

O não crescimento pode estar relacionado a diversos fatores, incluindo a ausência de nutrientes essenciais encontrados no substrato marinho original, alterações osmóticas provocadas pela substituição da água do mar por água destilada ou pela adição de carboidratos e proteínas específicas e a especificidade ecológica, onde as bactérias são adaptadas a condições ambientais muito particulares, como a simbiose com o hospedeiro original (BONNET, 2019).

Esse resultado ressalta a importância de considerar o nicho ecológico original dos microrganismos durante a triagem funcional, já que a ausência de crescimento pode limitar a detecção de potenciais produtores de enzimas. Avaliações complementares com meios mais próximos do ambiente natural ou com ajustes de salinidade e pH poderiam ser úteis em trabalhos futuros (KRULWICH, 2011).

As esponjas marinhas, por serem organismos filtrantes, abrigam uma diversidade bacteriana elevada, muitas vezes maior do que outros substratos marinhos (CHENG *et al.*, 2020), como algas e briozoários, e frequentemente associada à produção de enzimas extracelulares. Essa riqueza microbiana está relacionada à capacidade das esponjas de reter grandes volumes de água, concentrando microrganismos e nutrientes em seu interior (TAYLOR *et al.*, 2007). Além disso, muitos dos microrganismos associados a esses invertebrados apresentam potencial para a produção de enzimas

extracelulares, como proteases e amilases, o que pode representar uma adaptação às condições específicas do microambiente da esponja (HENTSCHEL *et al.*, 2003).

As algas marinhas constituem um substrato propício para a colonização por comunidades microbianas complexas, influenciadas por fatores como a composição da parede celular, a produção de metabólitos secundários e a disponibilidade de nutrientes (EGAN *et al.*, 2013). Microrganismos associados a macroalgas têm demonstrado potencial para a produção de enzimas extracelulares, como celulasas, proteases e amilases, as quais auxiliam tanto na degradação de componentes da alga quanto na adaptação ao ambiente marinho (RAGHUKUMAR, 2008).

Um estudo identificou bactérias associadas a briozoários marinhos, localizadas em estruturas internas chamadas *funicular bodies* e filamentos que conectam os zoóides, sugerindo uma relação simbiótica estável (KARAGODINA *et al.*, 2018). Embora o foco principal tenha sido a produção de metabólitos, é provável que essas bactérias também produzam enzimas extracelulares como celulasas, amilases e proteases, semelhantes às encontradas em outros organismos marinhos sésseis. Isso reforça o potencial dos briozoários como fonte alternativa na triagem de microrganismos com interesse biotecnológico.

Dessa forma, o maior número de isolados com atividade enzimática observado em amostras oriundas de esponjas pode estar diretamente relacionado às características ecológicas desse substrato, que favorecem tanto a colonização quanto a seleção de bactérias com alta capacidade metabólica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que ambientes marinhos, especialmente organismos como esponjas, representam fontes ricas e promissoras de bactérias com potencial biotecnológico, destacando-se na produção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial. Por meio da coleta de amostras de esponja, briozoário e alga no litoral do Paraná, foi possível isolar 16 linhagens bacterianas morfologicamente distintas, que foram submetidas a triagens qualitativas para avaliar a produção de celulases, amilases e proteases. Os testes revelaram que 75% dos isolados apresentaram pelo menos uma atividade enzimática, sendo que três linhagens demonstraram capacidade de produzir simultaneamente as três enzimas testadas, evidenciando seu alto potencial de aplicação em bioprocessos.

As metodologias empregadas permitiram observar que a esponja foi o substrato com maior diversidade e rendimento enzimático, o que pode estar relacionado à sua natureza filtradora e à complexidade do seu microambiente, que favorece a colonização de microrganismos metabolicamente ativos. Por outro lado, o não crescimento de algumas linhagens, especialmente oriundas do briozoário, em meios seletivos, sugere exigências fisiológicas específicas que podem limitar seu cultivo em condições padrão de laboratório. Esse achado reforça a importância de considerar o nicho ecológico e adaptar as condições experimentais ao perfil metabólico dos microrganismos.

Os resultados alcançados respondem de forma satisfatória aos objetivos propostos, comprovando a viabilidade de obtenção de linhagens bacterianas enzimaticamente ativas a partir de amostras marinhas. Estudos futuros são necessários na tentativa de quantificar e caracterizar, utilizando diferentes concentrações de substratos, pH, salinidade e temperatura, a atividade enzimática a partir das linhagens potencialmente produtoras das enzimas amilase, celulase e protease.

Assim, reforça-se não apenas o valor biotecnológico dos microrganismos marinhos, mas também a relevância da preservação e do estudo contínuo desses ecossistemas, ainda pouco explorados e com vasto potencial para aplicações industriais sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, H. *et al.* Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 614, 2023.
- AHMED, N. E.; SALEM, S. S.; HASHEM, A. H. Statistical optimization, partial purification, and characterization of phytase produced from *Talaromycespurpureogenus* NSA20 using potato peel waste and its application in dyes de-colorization. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, p. 4417–4431, 2022.
- ALABSSAWY, A. N.; HASHEM, A. H. Bioremediation of hazardous heavy metals by marine microorganisms: a recent review. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 3, 15 fev. 2024.
- AL-AGAMY, M. *et al.* Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from Marine Actinomycetes. **BioMed Research International**, p. 1–15, 2021.
- AMEEN, F.; ALNADHARI, S.; AL-HOMAIDAN, A. A. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 224–231, 2021.
- ANDUALEM, B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation. **International Food Research Journal** v. 21, n. 2, 1 jan. 2014.
- ASTOLFI, S.; SILVA, C.; BIGI, M. Bioprospecção e biotecnologia, **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45–80, 22 jan. 2015.
- BAHATKAR, B.P. Isolation, screening and identification of cellulose-degrading bacteria from different types of samples. **The Pharma Journal**. www.thepharmajournal.com. Disponível em: <<http://www.thepharmajournal.com>>. Acesso em: 23 jul. 2025.
- BARZKAR, N. *et al.* Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks, **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 335–346, 2018.
- BERNAL, S. P. F. *et al.* Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: isolation, enzymatic activity and dye discoloration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, 2021.
- BHARDWAJ, N. *et al.* Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, 2021.
- BHAT, M.K., Cellulases and related enzymes in biotechnology, **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355–383, 2000.
- BIROLI, W. G.; LIMA, R. N.; PORTO, A. L. M. Applications of Marine-Derived Microorganisms and Their Enzymes in Biocatalysis and Biotransformation, the Underexplored Potentials. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

BOLLMANN, M. et al. World Ocean Review 1 (WOR1). Living with the oceans: a report on the state of the world's oceans. Technical Report, **World Ocean Review**, 2010. Disponível em: <<http://worldoceanreview.com/en/wor-1/>>. Acesso em: 20 abril. 2024.

BONNET, M. et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. **New Microbes and New Infections**, v. 34, n. 34, p. 100622, 2019.

CHENG, M. et al. Biological and Chemical Diversity of Marine Sponge-Derived Microorganisms over the Last Two Decades from 1998 to 2017. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 853, 2020.

CHENG, T.H. et al. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00482, 2020.

CORONADO, M, Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 67–71, 2000.

CRISTÓBAL, H. et al. Diversity of protease-producing marine bacteria from sub-antarctic environments. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 590–600, 2011.

CUI, J. et al. The Glycine-Glucolipid of *Alcanivorax borkumensis* Is Resident to the Bacterial Cell Wall. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 16, 2022.

DALMASO, G.; FERREIRA, D. ; VERMELHO, A.. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1925–1965, 2015.

DE SANTI, C. et al, Bioprospecting around Arctic islands: Marine bacteria as rich source of biocatalysts, **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 238–253, 2015.

DING, J.; WU, B. ; CHEN, L., Application of Marine Microbial Natural Products in Cosmetics, **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

EGAN, S. et al. The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 462–476, maio 2013.

ERFANIMOGHADAM, M. R. ; HOMAELI, A. Identification of New Amylolytic Enzymes from Marine Symbiotic Bacteria of *Bacillus* Species. **Catalysts**, v. 13, n. 1, p. 183, 2023.

FARHA, A.K. et al, Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea, **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 253–258, 2018.

FATANI, S. et al. Genome sequencing and identification of cellulase genes in *Bacillus paralicheniformis* strains from the Red Sea. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, 2021.

FOUDA, A.; KHALIL, A. M. A.; EL-SHEIKH, H. H.; ABDEL-RAHMAN, E. M.; HASHEM, A. H. Biodegradation and detoxification of bisphenol-A by filamentous fungi screened from nature. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 2, p. 123–132, 2015.

GARCIA, D. O. *et al.* Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 157–162, 2002.

GOEL, C. *et al.* Antibiofilm Potential of Alpha-Amylase from a Marine Bacterium, *Pantoea agglomerans*, **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2022, p. 1–10, 2022.

GOPINATH, S. C. B. *et al.* Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 1, p. 1–9, 2017.

GOUDRIAAN, M. *et al.* A stable isotope assay with ¹³C-labeled polyethylene to investigate plastic mineralization mediated by *Rhodococcus ruber*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 186, p. 114369, 2023.

GU, Y.. The effect of buffer pH on enzyme activity. **Theoretical and Natural Science**, v. 33, n. 1, p. 144–154, 2024.

HASHEM, A. H.; SAIED, E.; HASANIN, M. S. Green and ecofriendly bio-removal of methylene blue dye from aqueous solution using biologically activated banana peel waste. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, p. 100333, dez. 2020.

HAZEN, T. C. *et al.* Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 204–208, 2010.

HENTSCHEL, U. *et al.* Microbial Diversity of Marine Sponges. **Sponges (Porifera)**, p. 59–88, 2003.

KARAGODINA, N. P. *et al.* Ultrastructural evidence for nutritional relationships between a marine colonial invertebrate (Bryozoa) and its bacterial symbionts. **Symbiosis**, v. 75, n. 2, p. 155–164, 3 nov. 2017.

KARMAINSKI, T. *et al.* High-quality physiology of *Alcanivorax borkumensis* SK2 producing glycolipids enables efficient stirred-tank bioreactor cultivation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.

KNAPIK, J.; ROPKA-MOLIK, K. ; PIESZKA, M.. Genetic and Nutritional Factors Determining the Production and Quality of Sheep Meat – A Review. **Annals of Animal Science**, v. 17, n. 1, p. 23–40, 2017.

KOPF, A.; SCHNETZER, J.; GLÖCKNER, F. O. Understanding Marine Microbes, the Driving Engines of the Ocean. **Frontiers for Young Minds**, v. 4, 19 jan. 2016.

KOSTKA, J. E. *et al.* Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, 2011.

KRULWICH, T. A.; SACHS, G. ; PADAN, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 330–343, 2011.

LAMA, L. *et al*, Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus, **Research in Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 478–484, 2005.

LEE, S.M. ; KOO, Y.M. , Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in Fed-Batch mode, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 229–233, 2001.

LOPES, I. R.; *et al*. Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes. **Revista da Biologia**, v. 22, n. 1, p. 32–46, 29 jun. 2023.

MALDONADO-RUIZ, K.; PEDROZA-ISLAS, R.; PEDRAZA-SEGURA, L. Blue Biotechnology: Marine Bacteria Bioproducts. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 697–697, 29 mar. 2024.

MCGENITY, T. J.; *et al*. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. **Aquatic Biosystems**, v. 8, n. 1, p. 10, 2012.

MEDDEB-MOUELHI, F.; MOISAN, J. K. ; BEAUREGARD, M. A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 66, p. 16–19, 2014.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M. ; SREE, A. Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. **Acta Biotechnologica**, v. 23, n. 1, p. 75–84, 2003.

MOU, H. *et al*. Editorial: Marine Microorganisms and Their Enzymes With Biotechnological Application. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

MURIEL-MILLÁN, L. F.; MILLÁN-LÓPEZ, S.; PARDO-LÓPEZ, L. Biotechnological applications of marine bacteria in bioremediation of environments polluted with hydrocarbons and plastics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 13 set. 2021.

NALINI, S. *et al*, Antibacterial macro molecules from marine organisms, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 696–710, 2018.

PARDO-LÓPEZ, L. Marine bioprospecting. **Routledge eBooks**, p. 33–44, 30 set. 2019.

PAULINO, V. *et al*. Bioprospecting of Marine Organisms: Exploring Antibacterial Activities in Aqueous and Organic Extracts. 2025.

POLI, A. *et al*. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, 16 maio 2017.

POTUMARTHI, R.; CH., S. ; JETTY, A., Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of

aeration and agitation regimes, **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 185–192, 2007.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19–35, 2008.

REHMAN, S.U. *et al*, Sorbicillinoid Derivatives From Sponge-Derived Fungus *Trichoderma reesei* (HN-2016-018), **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, 2009.

SÁNCHEZ-CLEMENTE, R. *et al*. Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. **Proceedings**, v. 2, n. 20, p. 1297, 22 out. 2018.

SARAVANAN, P; *et al*. Exploring Seaweed-Associated Marine Microbes: Growth Impacts and Enzymatic Potential for Sustainable Resource Utilization. **Indian journal of microbiology/Indian Journal of Microbiology (Print)**, 3 mar. 2024.

SOUZA, P. M. Produção de protease por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2015.

SRINIVASAN, M C ; RELE, M V, Microbial Xylanases for PaperIndustry, **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 137–142, 1999.

SU, H. *et al*. Diversity of cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases associated to scleractinian corals. **PeerJ**, v. 8, p. e9055, 2020.

TAYLOR, M. W. *et al*. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 295–347, 2007.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, abr. 1982.

TOLEDO, T. R. *et al*, Potent Anti-Inflammatory Activity of PyrenocineA Isolated from the Marine-Derived Fungus *Penicillium paxilli* Ma(G)K, **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

TRINCONE, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 3, p. 241–256, 1 out. 2010.

TRINCONE, A. Update on Marine Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes: Biotechnological Applications. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 901, 13 abr. 2018.

WANG, Y.; SONG, Q. ; ZHANG, X. H.. Marine Microbiological Enzymes: Studies with Multiple Strategies and Prospects. **Marine Drugs**, v. 14, n. 10, p. 171, 2016.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N. ; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257–266, 2007.

YOSHIDA, S. *et al.* A Bacterium That Degrades and Assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 2016.

ZHANG, J. W. ; ZENG, R. Y. Purification and Characterization of a Cold-Adapted α -Amylase Produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 75–82, 2007.