



MARINHA DO BRASIL

INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA – IEAPM

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE – UFF

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA – PPGBM

MARCELO TORRES ALVAREZ

**INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AGARASES POR BACTÉRIAS
ASSOCIADAS A MACROALGAS MARINHAS DO LITORAL FLUMINENSE**

NITERÓI - RIO DE JANEIRO

2025

MARCELO TORRES ALVAREZ

**INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AGARASES POR BACTÉRIAS
ASSOCIADAS A MACROALGAS MARINHAS DO LITORAL FLUMINENSE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e à Universidade Federal Fluminense (UFF), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

NITERÓI - RIO DE JANEIRO

2025

Biblioteca do IEAPM

A473i Alvarez, Marcelo Torres

Investigação da produção de agarases por bactérias associadas a macroalgas marinhas do litoral fluminense / [por] Marcelo Torres Alvarez.-- Arraial do Cabo: IEAPM, 2025.

48 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Marinha) - Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e Universidade Federal Fluminense - IEAPM/UFF, Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, Arraial do Cabo, 2025.

1. Biotecnologia marinha. 2. Macroalga. 3. Bactérias.
I.Oliveira, Bruno Francesco Rodrigues de. II. Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira.
III. Universidade Federal Fluminense IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 660.6

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 65

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Ao vigésimo oitavo dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e cinco, às nove horas, pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, em Arraial do Cabo - RJ realizou-se, de forma remota, a prova de Defesa de Dissertação, intitulada: “Investigação da produção de agarases por bactérias associadas a macroalgas marinhas do litoral fluminense” de autoria do mestrando **Marcelo Torres Alvarez**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, em nível de Mestrado. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores: Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Presidente, Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Membro Interno, Dra. Izadora Cristina Moreira de Oliveira – Universidade de Brasília (UnB) – Membro Externo, Dra. Louisi Souza de Oliveira – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Suplente. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o candidato foi aprovado pela Banca Examinadora. Foi concedido um prazo de 30 dias para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora, apresentar o trabalho em sua redação definitiva, atender ao requisito de publicação estabelecido nas normas do PPGBM e entregar a documentação necessária para a elaboração do diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca e pelo candidato.

Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira (UFF)

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA**
Data: 28/03/2025 12:29:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes (IEAPM)

Documento assinado digitalmente
 **GISELLE PINTO DE FARIA LOPES**
Data: 28/03/2025 21:45:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Izadora Cristina Moreira de Oliveira (UnB)

Documento assinado digitalmente
 **IZADORA CRISTINA MOREIRA DE OLIVEIRA**
Data: 28/03/2025 17:04:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Louisi Souza de Oliveira (IEAPM)

Documento assinado digitalmente
 **LOUISI SOUZA DE OLIVEIRA**
Data: 29/03/2025 20:16:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do Candidato:

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO TORRES ALVAREZ**
Data: 31/03/2025 13:16:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RESUMO

As macroalgas marinhas são organismos fotossintetizantes altamente diversificados, capazes de produzir metabólitos de alto valor agregado, os quais podem ser utilizados como componentes em diversos produtos biotecnológicos essenciais para a vida moderna. As macroalgas marinhas possuem relações ecológicas com diversos seres vivos, dentre eles os micro-organismos, incluindo bactérias produtoras de enzimas específicas, particularmente as enzimas ativas em carboidratos (CAZymes). Dentre essas CAZymes, destacam-se as agarases, capazes de hidrolisar o polissacarídeo ágar presente na parede celular de algas do filo *Rhodophyta*. Nesse contexto, a prospecção de microrganismos produtores de agarases se faz essencial para descoberta de novos biocatalisadores industriais, especialmente diante da multiplicidade de aplicações de enzimas agarolíticas e os oligossacarídeos biologicamente ativos derivados de sua ação. Este estudo tem como objetivo isolar e investigar a diversidade de bactérias produtoras de agarases em macroalgas coletadas em diferentes cidades do do litoral fluminense. Um total de 26 espécimes de macroalgas marinhos abrangendo os gêneros *Ulva* (*Chlorophyta*), *Sargassum* (*Phaeophyceae*), *Laurencia* (*Rhodophyceae*) e *Codium* (*Chlorophyta*) foram coletadas em 6 expedições: 2 na Enseada do Bananal (Niterói, RJ); 1 na Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ); 1 Praia da Urca (Rio de Janeiro, RJ); 2 Praia Rasa (Armação dos Búzios, RJ). Uma soma de 583 bactérias foram isoladas nos meios Marine, Marine 1:10, MMM, MMM + agarose, MMM + alginato, ágar amido caseína, MMM + óleo e LB. Após triagem da produção dessas enzimas em meio de Hu, um conjunto de 286 das 583 bactérias (49,05%) apresentaram atividade agarolítica. Um total de 125 de 273 bactérias potencialmente agarolíticas (45,79%) testadas exibiram atividade em testes de perfil catabólico em MMM adicionado de agarose para avaliação do consumo dessa forma do polissacarídeo como única fonte de carbono. Complementarmente foi realizado a identificação de bactérias verdadeiramente agarolíticas, capazes de gerar depressão e/ou liquefação do ágar e/ou agarose durante o crescimento nos meios de isolamento e nos meios adotados nessa etapa de triagem. Durante o isolamento foram identificadas 15 estirpes consideradas verdadeiramente agarolítica, entretanto, apenas 8 obtiveram resultado positivo nas etapas de atividade enzimática, das quais 2 também geraram depressão na etapa de MMM+agarose e 1 gerou depressão em meio de Hu. Em particular, todas essas amostras foram isoladas das macroalgas coletadas em Praia Rasa (Armação dos Búzios), majoritariamente do gênero *Codium*. Após envio para identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF, uma soma de 309 de 437 amostras foram classificadas com confiabilidade a nível de gênero, sendo o gênero mais predominante de *Vibrio*, com 215 estirpes (69,8%). Com base nos resultados obtidos, as etapas selecionadas no estudo notabilizam uma promissora fonte de rastreamento para bactérias agarolíticas.

Palavras-chave: macroalgas marinhas, bactérias, CAZymes, agarases.

ABSTRACT

Marine macroalgae are highly diversified photosynthetic organisms capable of producing high-value metabolites, which can be used as components in various biotechnological products essential for modern life. Marine macroalgae have ecological relationships with various living beings, including microorganisms, such as bacteria that produce specific enzymes, particularly carbohydrate-active enzymes (CAZymes). Among these CAZymes, agarases stand out, capable of hydrolyzing the agar polysaccharide present in the cell wall of algae of the phylum Rhodophyta. In this context, the prospecting of agarase-producing microorganisms is essential for the discovery of new industrial biocatalysts, especially given the multiplicity of applications of agarolytic enzymes and biologically active oligosaccharides derived from their action. This study aims to isolate and investigate the diversity of agarase-producing bacteria in macroalgae collected in different cities on the coast of Rio de Janeiro. A total of 26 marine macroalgae specimens covering the genera *Ulva* (Chlorophyta), *Sargassum* (Phaeophyceae), *Laurencia* (Rhodophyceae), and *Codium* (Chlorophyta) were collected in 6 expeditions: 2 in Enseada do Bananal (Niterói, RJ); 1 in Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ); 1 in Praia da Urca (Rio de Janeiro, RJ); 2 in Praia Rasa (Armação dos Búzios, RJ). A total of 583 bacteria were isolated in various media, including Marine, Marine 1:10, MMM, MMM + agarose, MMM + alginate, casein starch agar, MMM + oil, and LB. After screening for agarase production in Hu medium, 286 of the 583 bacteria (49.05%) showed agarolytic activity. A total of 125 of 273 potentially agarolytic bacteria (45.79%) tested exhibited activity in catabolic profile tests in MMM added with agarose to evaluate the consumption of this polysaccharide form as the sole carbon source. Additionally, the identification of truly agarolytic bacteria, capable of generating depression and/or liquefaction of agar and/or agarose during growth in isolation media and screening media, was performed. During isolation, 15 strains were identified as truly agarolytic, but only 8 obtained positive results in enzymatic activity stages, of which 2 also generated depression in the MMM+agarose stage and 1 generated depression in Hu medium. Notably, all these samples were isolated from macroalgae collected in Praia Rasa (Armação dos Búzios), mostly from the genus *Codium*. After submission for identification by MALDI-TOF mass spectrometry, a total of 309 of 437 samples were classified with reliability at the genus level, with *Vibrio* being the most predominant genus, with 215 strains (69.8%). Based on the results obtained, the selected stages in the study highlight a promising source of tracking for agarolytic bacteria.

Keywords: marine macroalgae, bacteria, CAZymes, agarases

**Dedico primeiramente a Deus pelo dom da vida.
A meus falecidos avós Lydia Alvarez e Moacir Barbosa.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aquele que me segura em suas mãos e abençoa sempre os meus passos, à Deus Pai, Filho e ao Espírito Santo.

À Universidade Federal Fluminense (UFF), ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por me acolher e proporcionar todas as ferramentas necessárias para a conclusão deste trabalho.

À minha esposa Taiane que pelo amor vivido na graduação me deu o maior presente da minha vida: a minha filha Pérola Maria, dedicada a Nossa Senhora, mãe do filho Jesus.

Aos meus pais, Marco e Maria Amália, meu irmão, Mateus, a minha avó Maria do Socorro e a todos os familiares próximos por todo apoio e sacrifício desde a minha infância, tornando possível realizar cada momento até aqui sonhado.

A minha segunda família, do nosso grandioso Laboratório de Bacteriomas Marinhos (BacMar) representada pelo Prof. Dr. Bruno Francesco, Eduardo Costalonga e Érica Monteiro. O professor Bruno é uma pessoa excelente! Um grande professor e orientador com um conhecimento inimaginável. Uma pessoa com uma imensa humildade e carinho pelo que faz. Me aceitou no seu projeto mesmo sabendo das minhas dificuldades, tanto no trabalho quanto no pouco conhecimento na área de Microbiologia. Mesmo assim, sempre muito paciente, respeitoso e empático desde às nossas atividades no laboratório até nos projetos que pudemos ir juntos, como foi o caso da viagem ao RedeAlgas. Já o Eduardo é uma mente brilhante e um futuro cientista brasileiro que alcançará lugares gigantescos. Desde que o conheci já me tornei fã do conhecimento que ele tinha e da força de vontade que o move no âmbito acadêmico. Um rapaz novo, mas com uma sabedoria imensa, com uma humildade inigualável e uma vontade de tornar o mundo melhor pelo conhecimento. Já a Érica chegou um pouco depois, mas, foi logo cativando o grupo com sua irreverência e sensatez tornando o ambiente mais engraçado e cativante para todos nós. Trouxe ainda um pouco de óleo para nossas atividades e muito remexo nas mãos com um vortex. Saibam que sou eternamente grato pela ajuda de vocês em todos os sentidos, e estarei sempre à disposição para tudo que precisarem.

À professora Marinella Laport e seus alunos, principalmente a Anna e ao Gabriel que sempre se propuseram a ajudar em tudo que eu necessitava durante os experimentos realizados na UFRJ.

À professora Giselle Lopes que me apresentou ao professor e meu orientador Bruno Francesco dando início a essa jornada no BacMar.

Aos órgãos de fomento *Office of Naval Research* (ONR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos os professores, técnicos e alunos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho e meu crescimento pessoal e profissional, fica meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspectos da morfologia da macroalga *Sargassum*.

Figura 2. Principais tipos de ramificações nas macroalgas.

Figura 3. Os três principais grupos taxonômicos de macroalgas: (a) filo Chlorophyta - algas verdes; (b) filo Rhodophyta - algas vermelhas; (c) filo Ochrophyta - algas marrons ou pardas.

Figura 4. Alternância de gerações nas macroalgas.

Figura 5. Principais utilizações biotecnológicas das macroalgas.

Figura 6. Diagrama conceitual representativo das diversas funções desempenhadas pelos microrganismos no holobionte macroalga ao longo de seu ciclo de vida (representado por setas roxas), abrangendo desde a fase reprodutiva (liberação e fixação de esporos), passando pela morfogênese e crescimento, até as respostas fisiológicas adaptativas a estresses bióticos (como proteção contra patógenos e incrustações) e abióticos. As setas pretas representam os fluxos de nutrientes, metabólitos ou sinais trocados entre os microrganismos parceiros e a alga hospedeira.

Figura 7. Estrutura química do ágar: (a) unidades de repetição na cadeia linear de agarose: agarobiose com a ligação O-glicosídica $\alpha(1\rightarrow3)$ e neoagarobiose com a ligação O-glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$; (b) agarose e agarpectina, com a potencial presença dos grupamentos sulfato na agarpectina.

Figura 8. Hidrólise enzimática do ágar. Com exceção de G (referente à galactose), todas as demais abreviaturas e detalhes estão devidamente apresentados e discutidos acima.

Figura 9. Fluxograma das principais etapas da metodologia do presente estudo.

Figura 10. Mapa do estado do Rio de Janeiro com locais de coleta indicados (à esquerda) e as respectivas fotos obtidas nos dias das expedições das coletas (à direita): (a) mapa geral do estado do Rio de Janeiro com foco na costa e respectivos locais de coleta destacados com ícones de pinos em vermelho (Fonte: *Google Maps*); (b) Enseada do Bananal (Niterói, RJ); (c) Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ); (d) Praia da Urca (Rio de Janeiro, RJ); (e) Praia Rasa (Armação dos Búzios, RJ).

Figura 11. Número total, origem e distribuição dos espécimes de macroalgas marinhas coletadas em diferentes cidades do litoral do estado do Rio de Janeiro no presente estudo: (a) total de espécimes de hospedeiros recuperados por sítio de coleta; (b) distribuição em função da afiliação taxonômica da macroalga marinha coletada.

Figura 12. Distribuição do número total de bactérias isoladas a partir das macroalgas marinhas coletadas nas diferentes cidades do litoral do estado do Rio de Janeiro em função: **(a)** local de coleta e **(b)** meio de isolamento de origem. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de barras. Siglas empregadas na legenda: Enr-MMM-agarose/alginato: MMM suplementado de agarose (1,0%) ou alginato de sódio (5,0%) empregado na estratégia de enriquecimento; LB: Luria-Bertani; MMM: meio mínimo marinho.

Figura 13. Resultados do ensaio de triagem da atividade agarolítica em meio de Hu das bactérias isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense. A degradação do ágar pode ser observada pela formação de halos claros em torno da massa puntiforme de crescimento bacteriano em contraste com o fundo de coloração marrom-escuro, área com o polissacarídeo-alvo ainda complexado com o iodo do lugol adicionado para revelação do ensaio.

Figura 14. Distribuição do total de bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense após triagem em meio de Hu, com resultado geral frente: (a) ao total de UFCs isoladas e submetidas ao rastreo; (b) em função do local de coleta. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação dos gráficos de pizzas e barras.

Figura 15. Intervalos de valores de Índice Enzimático (IE) observados para as bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas após triagem em meio de Hu. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de pizza.

Figura 16. Resultados do ensaio de perfil catabólico em MMM acrescido de agarose (1,0%; m/v) das bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense. O consumo de agarose devido a produção de agarases pode ser verificada pela formação de halos claros em torno da massa puntiforme de crescimento bacteriano em contraste com o fundo de coloração marrom-escuro, área com o polissacarídeo-alvo ainda complexado com o iodo do lugol adicionado para revelação do ensaio.

Figura 17. Distribuição do total de bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense após triagem em MMM suplementado com agarose com gráficos de *donuts* representativos por sítio de coleta. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação dos gráficos.

Figura 18. Identificação taxonômica a nível de gênero das estirpes bacterianas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no presente estudo. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de barras. Outros incluem representantes dos seguintes gêneros: *Kocuria* (2), *Metabacillus* (2), *Micrococcus* (2), *Phaeobacter* (1), *Photobacterium* (1), *Priestia* (1), *Pseudalkalibacillus* (1), *Pseudomonas* (1), *Rosellomora* (1), *Staphylococcus* (1), *Sutcliffeiella* (1) e *Tenacibaculum* (1).

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (0,8%; m/v) dos amplicons dos genes codificadores do 16S rRNA das bactérias consideradas potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas. Legenda: L = padrão de peso molecular de 1,0 kb; C - = controle negativo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividades auxiliares
AHG	3,6-anidro- α -L-galactopirranose (do inglês, “ <i>anhydrogalactose</i> ”)
AOs	Agaroligossacarídeos
APA	Área de Proteção Ambiental
ASW	Água do mar artificial (do inglês, “ <i>artificial seawater</i> ”)
BacMar	Laboratório de Bacteriomas Marinhos
BMM14	Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha
°C	Graus Celsius
CAGR	Taxa de crescimento anual composto (do inglês, “ <i>compound annual growth rate</i> ”)
CAZy	Banco de dados de CAZymes
CAZyme	Enzimas ativas em carboidratos (do inglês, “ <i>carbohydrate-active enzymes</i> ”)
CBM	Domínio de Ligação aos Carboidratos (do inglês, “ <i>carbohydrate binding domain</i> ”)
CE	Carboidrato esterase
Chl	Clorofila
cm	Centímetro
CGC	<i>Clusters</i> gênicos de carboidratos (do inglês, “ <i>CAZyme gene clusters</i> ”)
CMB	Instituto Biomédico
CO ₂	Dióxido de carbono
d.C.	Depois de Cristo
DMM	Departamento de Microbiologia Médica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Número EC (do inglês, “ <i>Enzyme Commission Number</i> ”)
EGB	Instituto de Biologia
FAO	A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, “ <i>Food and Agriculture Organization</i> ”)
GBM	Departamento de Biologia Marinha
GH	Glicosídeo hidrolase
GT	Glicosiltransferases

IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IMPG	Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
K-D-Gal	2-ceto-3-deoxi-L-galactonato
km ²	Quilômetros quadrados
LB	Meio Luria-Bertani
LPMO	polissacarídeos monooxigenases líticas dependentes de cobre (do inglês, “ <i>copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases</i> ”)
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light
MIP	Departamento de Microbiologia e Parasitologia
MMM	Meio mínimo marinho
MN	Museu Nacional
mL	Mililitro
NABH	neoagarobiose hidrolase
NAOs	Neoagaroligossacarídeos
NCBI	Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (do inglês “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio gasoso
PESET	Parque Estadual da Serra da Tiririca
ppm	Partes por milhão
pH	Potencial hidrogeniônico
PLs	Polissacarídeo liase
PPGBM	Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Marinha
PUL	locus de utilização de polissacarídeos (do inglês, “ <i>polysaccharide utilization locus</i> ”)
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SUS	Sistemas de utilização de amido (do inglês, “ <i>starch utilization system</i> ”)
μL	Microlitro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ALGAS MARINHAS.....	1
1.1.1 Morfologia e taxonomia.....	2
1.1.2 Ecologia das macroalgas.....	5
1.1.3 Ciclo de vida e reprodução das macroalgas	7
1.1.4 Utilização das macroalgas pelo homem	9
1.2. MICROBIOMA DAS MACROALGAS	12
1.3. ENZIMAS ATIVAS SOB CARBOIDRATOS (CAZYMES).....	17
1.4. AGARASES.....	20
2. HIPÓTESE	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 COLETA DOS ESPÉCIMES DE MACROALGAS MARINHAS	30
4.2. ISOLAMENTO BACTERIANO DAS MACROALGAS MARINHAS COLETADAS	31
4.3. TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE AGARASES PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS.....	33
4.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS MACROALGAS MARINHAS	34
4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS POTENCIAIS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AGARASES ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS	35
5. RESULTADOS	36
5.1. COLETAS DAS MACROALGAS MARINHAS	36
5.2 ISOLAMENTO BACTERIANO DAS MACROALGAS MARINHAS	36

5.3 TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE AGARASES PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS	38
5.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS MACROALGAS MARINHAS	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7.1. CONCLUSÕES	50
7.2. PERSPECTIVAS FUTURAS	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
9. ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

Apesar de possuir esse nome, a Terra é um planeta majoritariamente composto de água. Os oceanos ocupam 362.000.000 quilômetros quadrados (km²), representando cerca de 71% da superfície terrestre, além de constituírem no principal reservatório de água (98% do total), oferecendo trezentas vezes mais locais habitáveis do que habitats terrestres ou de água doce (Cavalcanti, 2021).

Dentre os seres residentes de águas oceânicas, o “macrofitobentos” abarca a comunidade de organismos vegetais macroscópicos que vivem no mar ou presos a superfícies sólidas. Isso inclui as macroalgas marinhas, que são elementos-chave no âmbito estrutural e funcional dos ecossistemas costeiros (Cavalcanti, 2021).

As interações hospedeiro e microrganismos desempenham um papel crucial nos ecossistemas marinhos, sendo responsabilidade das macroalgas o fornecimento de nutrientes enquanto a comunidade bacteriana promove o crescimento e proteção contra patógenos. Nessa representação, o indivíduo de maior tamanho é a macroalga, e o menor tamanho os microrganismos do ambiente, considerados como um holobionte (Egan et al., 2013). Por incluir toda a microbiota associada, essas interações podem ser benéficas, prejudiciais ou até sem consequências, podendo ser oportunistas, competitivas ou cooperativas. Essa informação genética combinada da microbiota associada é conhecida como microbioma (Hollants et al., 2012).

Além disso, como consequência da fonte de bioativos por macroalgas e suas interações com microbioma, tem atraído a indústria dos setores alimentício, farmacêutico, biomédico, biotecnológico, agrícola, aquicultura e energia. Vale ressaltar que a composição química das algas varia de acordo como salinidade, habitat geográfico, variação sazonal e condições ambientais como temperatura da água, concentração de nutrientes, intensidade da luz e acidificação dos oceanos (Menaar et al., 2020).

1.1. ALGAS MARINHAS

Algae é o plural de algas no latim, nome utilizado pelos romanos para identificar o que acreditaram ser plantas destituídas de raiz, caule e folhas, com coloração pardas e vulgarmente chamadas de “sargaços”, que surgiam nas praias pelas marés durante ressacas. Os organismos denominados de algas (do grego “*phycos*” = *algas*), são objetos de estudo da ficologia ou algologia. O termo alga não apresenta nenhum

sentido taxonômico ou filogenético, abrangendo um coletivo de organismos em diferentes grupos taxonômicos responsável pela produção de matéria primária em seus nichos ecológicos (Chapman, 2013).

As algas são seres vivos com a aptidão de sobreviver em locais que ofereçam umidade e luz suficientes, temporárias ou permanentes; podendo ser encontradas em ambientes de água doce, marinha e sobre a neve (Marques; Américo-Pinheiro, 2017). São organismos uni- ou pluricelulares, que possuem clorofila (pigmento responsável pela captação de energia solar), por isso são capazes de realizar a fotossíntese. Em outras palavras, transformar o material inorgânico (água e gás carbônico) com auxílio da luz solar captada, em material orgânico como a glicose, liberando oxigênio gasoso (O_2) (Pereira, 2021).

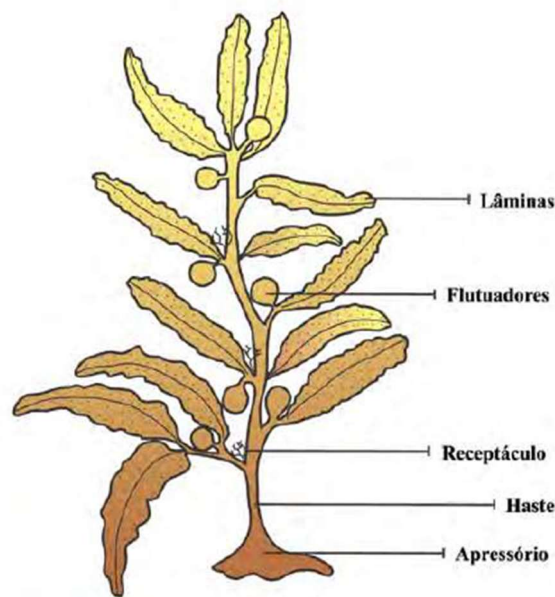
As macroalgas marinhas encontram-se distribuídas em zonas costeiras (próximas à costa) em diferentes pontos da zona intermarés, a porção da planície de maré quase integralmente coberta pelas águas na preamar e exposta na baixa-mar até profundidades maiores. Dentro dessa zona, podem se fixar em substratos de areia, cascalho e rochosos (Pereira, 2021). A variação de organismos em diferentes comunidades de macroalgas pode ser utilizada como bioindicadores de autoadaptação do ecossistema onde vivem. Além disso, os bancos de macroalgas submersos são ricos em biodiversidade, servindo de produtor de biomassa nas cadeias alimentares, habitat e refúgio reprodutivo para diversas espécies (Menaar et al., 2020).

1.1.1 Morfologia e taxonomia

Anatomicamente, os grupos de macroalgas marinhas apresentam grande diversidade de formas e tamanhos, por exemplo a alga marinha clorofícea *Valonia ventricosa*, conhecida popularmente como “olho-do-marinheiro” ou “alga perolada”. Ela se destaca como uma das maiores espécies unicelulares do mundo, podendo alcançar até cinco centímetros de diâmetro (Cocentino et al., 2010). Além disso, existem algas pardas da classe *Phaeophyceae* caracterizadas pelo seu grande tamanho, e responsável por criar autênticas florestas submersas, capazes de crescer 30 centímetros por dia, chegando até 65 metros de comprimento (Teixeira, 2013). Possuem formas bem simples como: incrustações, filamentos, lâminas, cilíndricas ou ramos.

As macroalgas possuem adaptações especiais em sua morfologia e fisiologia que a ajudam na sua sobrevivência no ambiente dinâmico marinho. O talo das macroalgas se divide em ramos, a parte que fica ereta é constituída pela estirpe e a lâmina. Além disso, possui um aparelho de fixação adaptado para ancorar a macroalga no substrato, denominado apressório (Carneiro; Cassano, 2021).

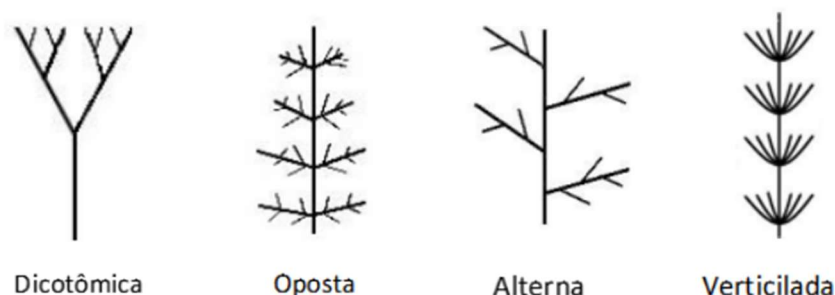
Figura 1. Aspectos da morfologia da macroalga *Sargassum* (Fonte: Carneiro, 2020).



Outra característica dentre as macroalgas é o seu tipo de identificação. Quanto à sua textura, podem ser observadas como áspera (algumas espécies possuem acúmulo de carbonato de cálcio em sua parede celular) e lisa. Quanto à sua consistência podem ser maleáveis ou rígidas. O substrato também interfere em sua posição corpórea, podendo ser ereta, incrustante ou prostrada. Sobre a forma corpórea, podem ser filamentosas, foliácea, espessa ou articulada (Fragoso, 2018).

A forma de ramificação dos eixos eretos é responsável pelo aspecto e determinação geral da espécie, podendo ser: dicotômica, oposta, alterna e verticilada (Fragoso, 2018).

Figura 2. Principais tipos de ramificações nas macroalgas (Adaptado de Fonseca Sá, 2019).

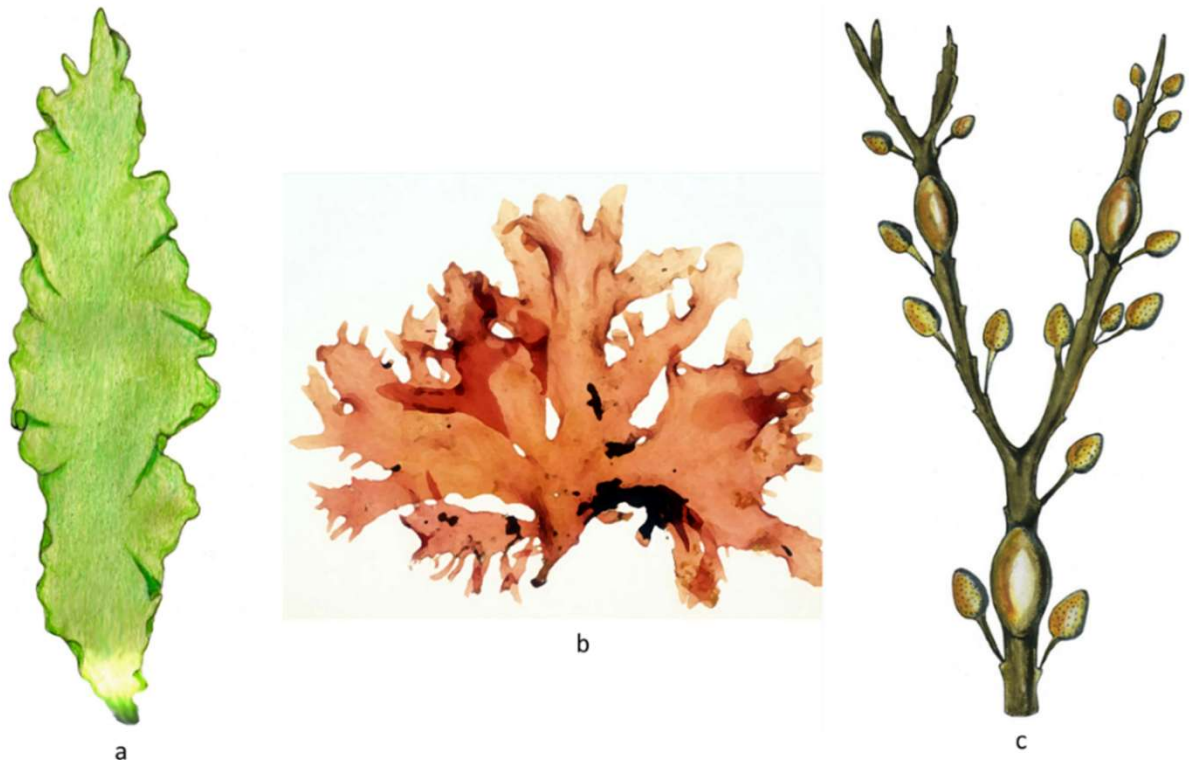


Além das suas classificações com base na estrutura morfológica, há também aquelas de acordo com a pigmentação desses organismos. Essa coloração nada mais é que a expressão visível de diferentes pigmentos fotossintéticos presentes em suas células (Pereira, 2021). As três principais classes de pigmentos fotossintéticos são: clorofilas, carotenóides (caroteno e xantofila) e ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina). As concentrações desses pigmentos variam de acordo com a adaptação das macroalgas de acordo com as condições ambientais e a profundidade onde vivem para a realização da fotossíntese (Dumay; Moranças, 2016).

As macroalgas verdes, incluídas no filo *Chlorophyta* (clorofíceas), possuem pigmentação parecida com as plantas vasculares, contendo clorofilas *a*, *b* e carotenóides. Já as macroalgas vermelhas estão no filo *Rhodophyta* (rodofíceas), possuindo clorofila *a*, ficobilinas e alguns carotenóides. Além delas, existem as macroalgas marrons ou pardas, pertencentes ao filo *Ochrophyta*, particularmente a classe *Phaeophyceae*, contendo as clorofilas *a*, *c* e carotenóides, sendo predominante a fucoxantina, responsável pela sua coloração (Pereira, 2021).

Esses pigmentos acessórios aumentam a amplitude do espectro luminoso que pode ser utilizado pelas macroalgas em processos fotossintéticos. Os principais pigmentos descritos se situam na classe das clorofilas e incluem a clorofila *a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3* e *d* (Muñoz-Miranda; Iñiguez-Moreno, 2023).

Figura 3. Os três principais grupos taxonômicos de macroalgas: (a) filo *Chlorophyta* - algas verdes; (b) filo *Rhodophyta* - algas vermelhas; (c) filo *Ochrophyta* - algas marrons ou pardas. Adaptado: Pereira, 2021).



1.1.2 Ecologia das macroalgas

As macroalgas marinhas possuem um importantíssimo papel na estrutura dos ecossistemas. Atuam como produtores primários na cadeia trófica, servem como local de berçário e desova para inúmeras espécies de invertebrados e peixes, incluindo as espécies comerciais. Além disso, servem como uma cobertura natural contra a erosão costeira, participando na formação de atóis e recifes (Marinho-Soriano et al., 2008).

De acordo com Eger e colaboradores (2023), as macroalgas podem contribuir para a biorremediação marinha e sequestro de carbono, bem como para a redução da acidificação dos oceanos e diminuição da poluição atmosférica. Da mesma forma, as florestas de macroalgas fornecem uma variedade de serviços ecológicos, incluindo suporte direto para pesca comercial, recreativa e de subsistência e aquicultura (Oppenheimer et al., 2019).

Também é importante ressaltar a importância da participação em serviços ecológicos com a associação com outros seres vivos. A biotecnologia de microrganismos associada ao substrato de macroalgas tem sido desenvolvida para distintas aplicações industriais e algumas espécies de algas se destacam por apresentar características de interesse da indústria (Simões et al., 2016).

Inundações e erosão são ameaças graves para as comunidades costeiras, as populações de macroalgas fornecem uma proteção a mais contra a elevação no nível do mar e o contato entre as forças das marés nos costões e na plataforma continental (Cotas et al., 2023). As macroalgas são influenciadas por fatores abióticos, podendo ser físicos, químicos e biológicos. Nos fatores físicos, encontramos as marés, exposição a ondas, luz e temperatura (Steigleder, 2015). Já nos fatores químicos, podem ser salinidade, gases dissolvidos e potencial hidrogeniônico (pH), bem como certos fatores biológicos, sendo a competição e predação os mais importantes (Viana et al, 2021).

Apesar das ondas exercerem um efeito mecânico destrutivo, promovem a circulação de água permitindo a distribuição de nutrientes, gases e sedimentos que favorecem a taxa de crescimento das macroalgas (Steigleder, 2015). Já a luz é importante para as macroalgas na fotossíntese. A intensidade luminosa varia ao longo do dia e das estações do ano, em função da inclinação dos raios solares e da nebulosidade local. A quantidade de luz que chega aos diferentes níveis do ecossistema marinho depende da transparência da água, associada à agitação marítima e ao grau de profundidade (González, Raboso, 2007). A temperatura é um fator físico que também delimita a população do ecossistema.

A salinidade é um fator químico que seleciona as espécies de macroalgas. O valor normal das águas superficiais para a maioria dos oceanos é entre 34 e 36 partes por mil (ppm), com o cloreto de sódio ou sal comum, sendo o componente majoritário. As macroalgas que conseguem viver em uma ampla faixa de salinidade, são características das áreas costeiras que periodicamente emergem (González; Raboso, 2007). Aquelas que necessitam de uma salinidade constante, são acantonadas para níveis inferiores (Fonseca, 2019).

Os gases dissolvidos são fatores limitantes na distribuição dos organismos. A quantidade de dióxido de carbono dissolvida constitui a principal fonte de carbono inorgânico necessário para a realização da fotossíntese. (Silva, 2021). O pH depende de diversos fatores entre os quais se destacam o teor de sais dissolvidos, a temperatura, a adição de água doce e, sobretudo, o teor em dióxido de carbono. Nas águas oceânicas, os maiores valores de pH ocorrem nas águas mais superficiais ricas em fitoplâncton. (Silva, 2021).

Nos fatores biológicos, a competição por recursos e espaço delimita o crescimento das macroalgas. Os organismos desenvolvem várias estratégias para eliminar os

indivíduos vizinhos. No caso das macroalgas, algumas são epífitas não estabelecem qualquer tipo de relação com o seu hospedeiro e crescem por cima destes, esmagando-os ou atrapalhando em sua captação de luz solar, como é o caso das macroalgas parda (*Sargassum* sp.) e as algas vermelhas (*Digenea simplex*) e *Bryothamnion triquetrum* (Silva, 2021).

1.1.3 Ciclo de vida e reprodução das macroalgas

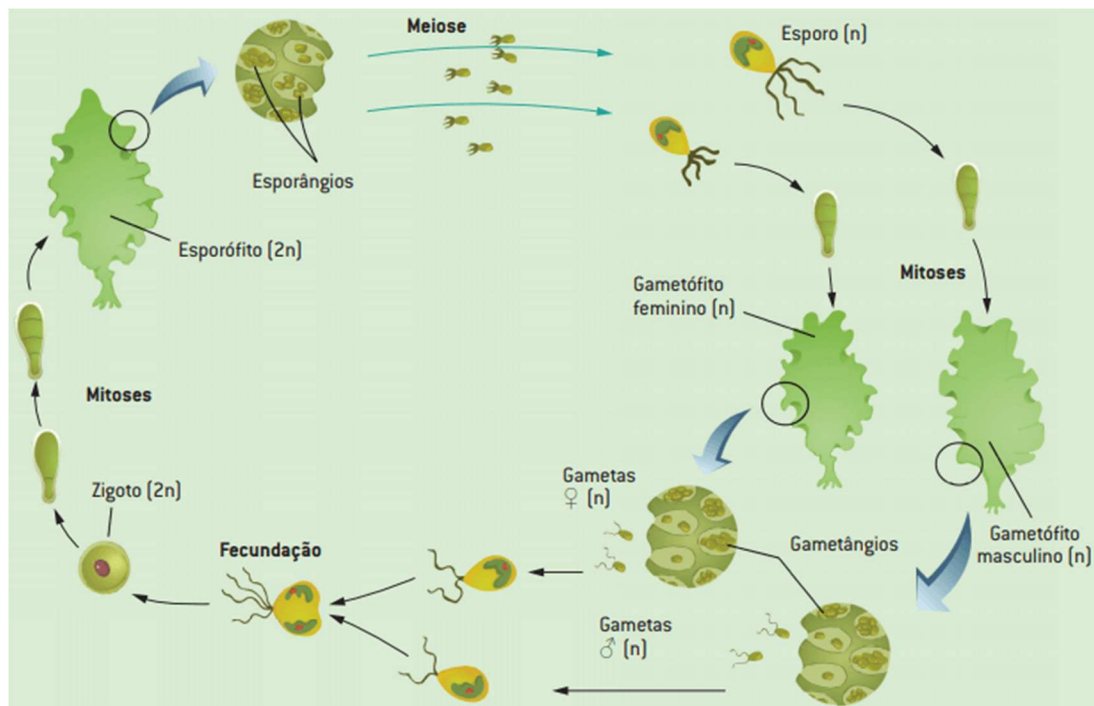
Nas macroalgas, existem três tipos de ciclo de vida: haplobionte haplonte, haplobionte diplonte e diplobionte. No ciclo haplobionte haplonte, também denominado meiose zigótica, apresenta apenas uma fase haplóide, processo exclusivo das algas verdes. Já no ciclo haplobionte diplonte também exibe apenas uma única fase diplóide, conhecida também como meiose gamética. Esse ciclo é presente em algas verdes e algas pardas. Além disso, há o ciclo diplobionte, também denominado de alternância de gerações. Nesse ciclo, ocorrem duas fases, também denominadas meiose esporica. Esses ciclos podem ocorrer nos três filos das algas, sendo que, nas *Rhodophytas* é observado a alternância de gerações, visto que podem apresentar duas fases (bifásico) ou três fases (trifásico) (Cardoso, 2018).

As formas de reprodução das macroalgas marinhas multicelulares podem ser subdivididas em assexuada e sexuada. Na reprodução assexuada, pode ocorrer pela fragmentação do talo, propágulos ou por esporos. Quando ocorre a fragmentação do talo, dá origem a outro ser vivo, geneticamente idêntico a alga parental, denominado de clone, tendo como exemplo a clorofícea *Codium* spp. Já na reprodução por propágulos, ocorre um aglomerado de células com a capacidade de se fixar no substrato e posteriormente originar um novo talo, observe na rodofícea *Polysiphonia* spp. (Fonseca, 2019). No processo de esporulação, há a formação de células formadas no interior de esporocistos, e que resultam de divisões mitóticas do núcleo da célula-mãe. No final da sua diferenciação, os esporos são liberados para o exterior dos esporocistos através de uma abertura na sua parede. Os esporos poderão ser móveis ou imóveis, contudo em ambos os casos, os esporos promovem a dispersão da espécie, fixam-se a um novo e distante substrato, germinam e originam aí um novo talo (Pereira, 2021).

Na reprodução sexuada, o ciclo de vida das macroalgas com gametas de sexos diferentes possui morfologia semelhante, ocorrendo uma reprodução denominada

como isogâmica. Nas macroalgas restantes em que as duas categorias dos gametas são morfologicamente diferentes, a reprodução é denominada heterogâmica. Em ambos os casos, após a liberação dos gametas na água, a fusão entre eles resulta numa célula denominada zigoto. Entretanto, existem casos em que o gameta feminino não é liberado para o exterior e a fecundação ocorre na macroalga feminina, processo denominado oogamia. (Fonseca, 2019).

Figura 4. Alternância de gerações nas macroalgas (Fonte: Lebarbenchon, 2019).



Na maioria dos casos por alternância de gerações (gametófito e esporófito) e de fases nucleares, ocorre duas fases de reprodução: uma fase haploide com n cromossomos e outra diplóide com $2n$ cromossomos (Fonseca, 2019). No processo da esporulação (haplóide), por meiose da célula se formam os gametófitos que se diferenciam em masculinos e femininos. Neles são formados os gametângios, estruturas onde se formam os gametas. Após isso, os gametas por fecundação dão origem ao zigoto (diplóide), e, por conseguintes sucessivas mitoses geram os esporófitos para dar continuidade ao mesmo processo de esporulação (Braune; Guiry, 2011).

Uma característica comum na maioria dos gêneros de macroalgas pardas é também a alternância heterofásica. Nesse tipo de alternância, ambas as gerações podem ser de aparência igual (alternância isomórfica de gerações, observados nas espécies dos gêneros *Ectocarpus* e *Dictyota*) ou diferentes (alternância heteromórfica

de gerações), nesse modelo ocorre uma redução do esporófito ou do gametófito (observado nas espécies do gênero *Laminaria*). Além disso, ocorre também uma ausência completa de alternância de gerações (por exemplo, as espécies do gênero *Fucus*) (Braune, Guiry, 2011).

Nas macroalgas verdes, é comum ocorrer a alternância heterofásica de gerações, habitualmente com gametófitos haplóides e esporófitos diplóides de aparência idêntica (alternância isomórfica, por exemplo as espécies do gênero, *Cladophora*). Porém neste mesmo grupo de macroalgas, surge também a alternância heteromórfica de gerações e, ainda, situações em que a alternância de gerações está ausente (por exemplo, nas espécies do gênero *Codium*) (Braune, Guiry, 2011).

1.1.4 Utilização das macroalgas pelo homem

Um dos maiores efeitos negativos das alterações climáticas é observado na agricultura. O aumento da temperatura do ar, umidade, secas extremas e alteração das épocas chuvosas afetam toda a cadeia produtora de alimentos, tornando-a duvidosa e gerando problemas na alimentação quanto na economia global (Cardoso, 2018).

Em contrapartida, a disponibilidade das macroalgas, mesmo que afetadas com o aquecimento global, é de grande importância para o meio ambiente, mas também para os setores considerados essenciais na sociedade humana, como por exemplo a alimentícia. A utilização de macroalgas para consumo humano tem registros escritos desde os séculos 4 d.C. no Japão e 6 d.C. na China (Figueira, Martins, 2020). Nos países asiáticos, esse consumo de macroalgas marinhas é tradicional e a exploração comercial envolve indústrias dos mais diversos setores, como têxtil, de medicamento, de cosmético e, principalmente, alimentício, gerando benefícios para a saúde da população e para a economia, respectivamente. Em contrapartida, no ocidente a exploração e consumo são ainda pouco evidenciados (Mota et al., 2014).

O cultivo de macroalgas marinhas é denominado algicultura ou ficocultura, e teve início no Japão há quase 200 anos. Pescadores japoneses empilhavam lâminas de *Porphyra* nas zonas costeiras de forma a aumentar a sua produção. Dos registros observados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), agência que lidera os esforços internacionais para combater a fome, a produção de algas global em 1995 era de 13,5 milhões de toneladas, pulando para mais de 30 milhões no ano de 2016 (Igarashi, 2021).

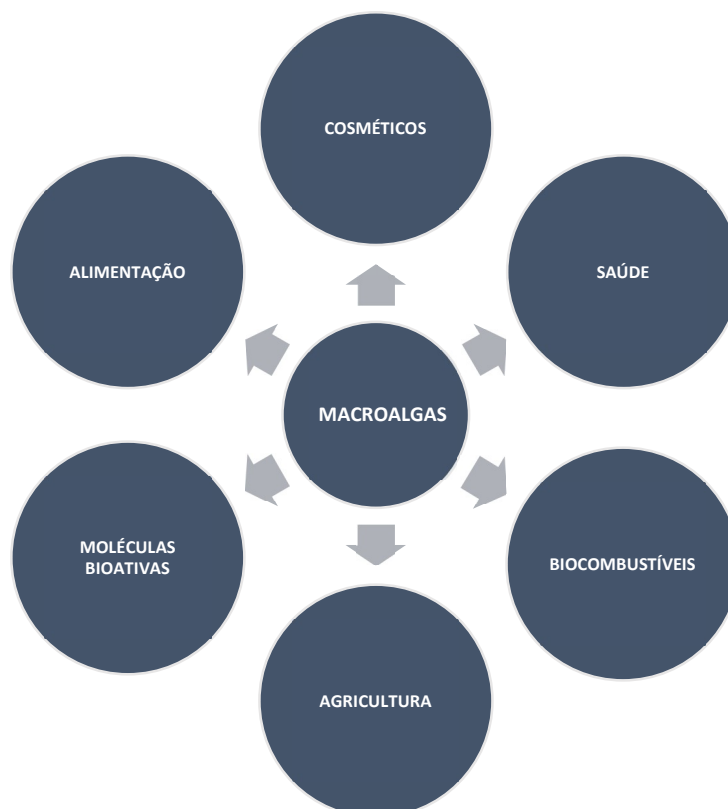
Há também a participação de algas em sítios arqueológicos. Os denominados sambaquis são caracterizados pela deposição de sedimentos, resíduos vegetais, restos de animais, artefatos arqueológicos e sepultamentos. Esses conteúdos acumulados intencionalmente revelam a ordem cronológica cultural de povos antepassados. No Brasil, esses sambaquis datam de 8.000 a 1.000 anos atrás, e representam ambientes ocupados pelos grupos sociais pré-coloniais adaptados a ambientes costeiros e ribeirinhos em cenários deposicionais (Boyadjian, 2024).

Entre as múltiplas afinidades dessas ciências, um dos campos mais desenvolvidos é o da arqueobotânica, cujos estudos estão concentrados nos vestígios de plantas, sejam eles madeiras, frutos, sementes, folhas, fibras, pólen, esporos, fitólitos ou algas. E, observando todo o cenário deposto, animais bentônicos e costeiros deveriam fazer parte da dieta desses ribeirinhos, denotando a importância das algas na alimentação desses indivíduos (Celant; Magri; Stasolla, 2015).

Caracterizando a utilização das macroalgas na indústria, na Europa teve o início de sua utilização incinerando-as para obtenção de compostos de sódio, potássio e usados na fabricação de vidros. No início do século XIX, foi descoberto pelo químico francês Bernard Courtois (1777-1838) a obtenção de iodo em macroalgas, e seu uso na medicina. Tais extrações foram utilizadas até a descoberta de reservas de iodo em países sulamericanos, como o Chile (Costa et al., 2016).

Os produtos processados de macroalgas ou pela associação das macroalgas com outros seres vivos possuem considerável valor agregado e são produzidos em pequena e média escala, principalmente na China, no Japão e nos Estados Unidos (Brasil, 2016). E, nesse contexto, a biotecnologia dos microrganismos tem evoluído bastante nas aplicações de algumas áreas industriais, sendo elas a procura de moléculas bioativas da associação de microrganismos, na alimentação ou suplementação dos seres humanos e de animais, produção de cosméticos, na área da saúde com a produção de novos fármacos, na produção de biocombustíveis para menor utilização de fontes vegetais residuais de áreas agropecuárias, no auxílio em agricultura e até como proteção ambiental, podendo ser observada na Figura 5 (Mayumi; Ota, 2021):

Figura 5. Principais utilizações biotecnológicas das macroalgas (Adaptado de Mayumi; Ota, 2013).



As moléculas bioativas podem ser de origem sintética ou natural, provenientes do metabolismo secundário das macroalgas e incluem diferentes tipos de substâncias, que variam a partir de ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos e peptídeos (Simões et al., 2016). Essas moléculas vêm sendo utilizadas para desempenhar 18 atividades biológicas cada vez mais significantes em função de suas habilidades antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, hipocolesterolêmica, entre outras (Tang et al., 2020).

Na alimentação, a importância das características morfológicas e fisiológicas das macroalgas vai interferir nos compostos presentes, dessa forma, algumas possuem um maior conteúdo mineral, outras um maior teor proteico, e algumas apresentam alto conteúdo de fibras (Soares; Fujii, 2012).

A aplicação de macroalgas marinhas mais comum tem sido na aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. No entanto, as macroalgas estão ganhando popularidade como “superalimentos” em todas as categorias de alimentos e bebidas, como alimento principal e complemento de alimentos funcionais, podendo ser adicionadas aos produtos cárneos, como bifes,

salsichas, bem como os peixes, derivados e óleos, para melhorar sua qualidade (Boukid; Castellari, 2021).

Extratos de algas e seus produtos são componentes de cosméticos, onde princípios ativos extraídos da biomassa de algas podem ser utilizados de três formas: como aditivos; como estabilização e preservação do produto; e como os compostos que cumprem uma função e atividade cosmética real (Michalak et al., 2020).

As algas também apresentam compostos fotoprotetores, como os aminoácidos semelhante as micosporinas, que podem ser aplicados na produção de bloqueadores solares, que protegem a pele contra as agressões das radiações solares e podem ser usados como ingredientes em formulações cosméticas para fornecer proteção contra a radiação ultravioleta (Cascarejo, 2018).

No quesito energia, o biocombustível é uma matéria que produz energia calorífica. Possui origem biológica não fóssil, fabricado a partir de produtos ou a partir de algas (Romão, 2021). Podem ser derivados de produtos agrícolas, porém os conflitos na mudança do uso da terra e a competição das culturas alimentares com as matérias-primas baseadas nas culturas levaram à consideração da biomassa de algas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Essa produção também possui desvantagens, visto que as tecnologias de produção da biomassa de macroalgas ainda são pequenas comparado a outros biocombustíveis, além disso, possui baixo teor de lipídios em suas células, diminuindo a eficiência na produção de biocombustíveis visto que, haverá a necessidade de utilização do carboidrato que seria utilizado para fermentação alcoólica (início da produção do etanol), no metabolismo da macroalga. (Meddipally et al, 2015).

O uso de compostos biológicos à base de organismos naturais, como as algas marinhas, vem apresentando também crescimento expressivo nos últimos anos no setor agrícola, com intuito de substituir a utilização de herbicidas, pesticidas e fertilizantes para o aumento da produção agrícola (Echert, 2019; Galind et al., 2019).

1.2. MICROBIOMA DAS MACROALGAS

Praticamente todos os seres vivos possuem superfícies, tanto internas quanto externas, habitadas por diversos grupos de microrganismos. Essas comunidades microbianas, cuja complexidade pode variar, mantém um equilíbrio dinâmico que demonstra resistência e resiliência diante de diferentes tipos de perturbações, incluindo fatores físicos, químicos e populacionais (Fischbach; Segre, 2016; Adair;

Douglas, 2017). Com a chegada do novo século, as simbioses passaram a ser reinterpretadas à luz do conceito de “holobionte” (do grego, “*holo*”, todo; “*biontos*”, ser vivo). Inicialmente empregado para descrever a relação entre corais e seus microrganismos associados (Rosenberg et al., 2007), esse termo foi ressignificado e atualmente é definido como “uma unidade de organização biológica composta pelo hospedeiro eucariótico multicelular e todos os seus microrganismos associados” (Rosenberg; Zilber-Rosenberg, 2016). Essas comunidades microbianas presentes em um ecossistema, conhecidas como microbiota, estão integradas a todo o conjunto de moléculas biológicas geradas pelos microrganismos, pelo hospedeiro e pelo ambiente ao redor, formando assim o microbioma (Marchesi e Ravel, 2015; Berg et al., 2020). A integração dos conteúdos genômicos dos microbiomas associados e de seus respectivos hospedeiros formariam o “hologenoma”, consolidando-se a “teoria da evolução do hologenoma”, pela qual o holobionte e seu hologenoma consistiriam em uma entidade única e, portanto, uma unidade de seleção evolutiva (Rosenberg; Zilber-Rosenberg, 2018), com a variação e fluxo gênico dos membros do microbioma desempenhando papéis-chave na origem e adaptações funcionais, bem como história evolutiva de seus hospedeiros (Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2021).

Considerando que a vida na Terra surgiu nos oceanos, é provável que os primeiros holobiontes surgiram de parcerias entre organismos procarióticos nessas condições primordiais, tendo impactado inclusive no surgimento dos eucariotos. Uma diversidade de sistemas holobiontes (ex., corais, esponjas, vermes de mar profundo, anêmonas do mar) estão distribuídos nos ecossistemas marinhos, os quais contribuem para as funções dos ecossistemas, via ciclagem biogeoquímica de elementos nutrientes, e para estruturar as populações, via defesa química (Dittami et al., 2021; González-Pech et al., 2024). Infelizmente, os efeitos relacionados do aquecimento global, acidificação oceânica, poluição marinha desenfreada com crescimento populacional em áreas costeiras tem colocado em risco a sobrevivência desses holobiontes. Em maior escala, esse cenário pode culminar em disrupção total não somente da cadeia trófica, mas também da perda de habitats e locais para reprodução e assentamento de inúmeras espécies da biota marinha e, em último nível, com impacto econômico e social nas regiões afetadas (Marzinelli et al., 2018; Vanwonterghem; Webster, 2020; Chai; Li; Li, 2024).

Assim como outros holobiontes marinhos, as macroalgas estabeleceram uma variedade de relações simbióticas com uma multitude de microrganismos de todos os

domínios da vida, incluindo bactérias, arqueias, fungos, protistas, além dos vírus, em todo espectro da simbiose. As concentrações celulares bacterianas podem variar de 10^2 até 10^7 por cm^2 da região tecidual das macroalgas (Ramanan et al., 2016; van der Loss et al., 2019). Esse microbioma associado podem estar localizados em toda a extensão da superfície do corpo da macroalga, sendo denominado epifítico, ou estar intrinsecamente presente entre as camadas celulares e, até mesmo, interiores celulares do hospedeiro, geralmente designado endofítico (Egan et al., 2016). Existem um número de fatores-chave locais determinantes para a colonização microbiana inicial das macrófitas, tais como disponibilidade de oxigênio, polímeros e nutrientes, além da produção de metabólitos bioativos interferentes do *quorum sensing* bacteriano e demais infoquímicos voláteis pelos hospedeiros e da capacidade de transição de um estilo de vida planctônico para biofilme pelos microrganismos colonizadores (Persson et al., 2011; Hollants et al., 2013; Saha et al., 2021). A composição taxonômica do microbioma associado das macroalgas marinhas flutua nas variadas regiões do corpo da macroalga e, de acordo, com fatores fisiológicos e bioquímicos do hospedeiro, além das condições ambientais (Ihua et al., 2020; Lemay et al., 2021).

A maior parte dos estudos em diversidade microbiana em macroalgas marinhas está concentrada nos últimos 15 anos na caracterização das comunidades bacterianas epifíticas, principalmente pela abordagem de metataxonômica, isto é, análises de ecologia microbiana com base no sequenciamento do gene codificador do 16S rRNA. Os filos bacterianos *Pseudomonadota*, em particular as classes Alpha- e Gammaproteobacteria, e *Bacteroidota* estão entre os dominantes, contudo é comum o encontro de representantes dos filos *Bacillota*, *Actinomycetota* e *Planctomycetota*, esse último com um gênero aparentemente conservado entre diferentes espécies de macroalgas feofíceas e clorofíceas, *Granulosicoccus* (Egan et al., 2016; Saha et al., 2024). Arqueias são geralmente encontradas em baixa abundância relativa nas macroalgas e, até o momento, foram mais frequentemente detectados membros da *Nitrososphaera* e metanogênicos do filo Metanobacteriota, seguidos em menor extensão de *Nanoarchaeales*, *Woesearchaeales*, *Bathyarchaeia* e *Lokiarchaeia* (Lian et al., 2024).

Ainda com dados majoritariamente derivados de estudos dependentes de cultivo, as macroalgas são colonizadas principalmente por ascomicetes endofíticos filamentosos, incluindo, mas não se limitando à *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*

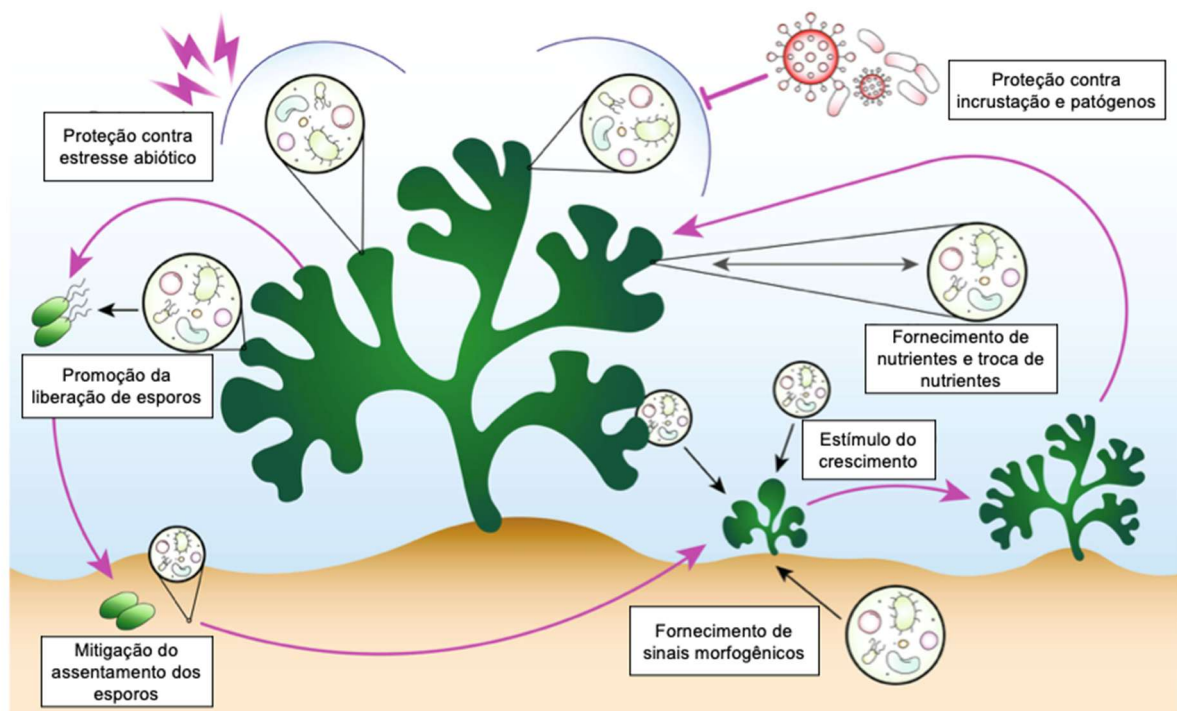
e *Pseudogymnoascus*, leveduras, incluindo *Metschnikowia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* e, em alguns casos, linhagens fúngicas ancestrais, como *Mortierellaceae*. A incorporação de métodos independentes de cultivo tem revelado um predomínio de Ascomycetes, incluindo potenciais novos táxons e que os micobiomas de macroalgas variam de acordo com a espécie do hospedeiro e tipo tecidual envolvido (Bonito et al., 2024). Ampliando para outros microeucariotos, notabiliza-se que Stramenopiles, Alveolata, Cercozoa e Endomyxa podem dominar as comunidades microbianas em certas espécies de feofíceas e que a maioria das linhagens presentes sequer foram ainda descritas, com potenciais patógenos distribuídos entre várias algas de diferentes regiões geográficas. Isso evidencia o quão incipiente se encontra o cenário da caracterização da microbiodiversidade eucariótica nesse holobionte (Bjorbaekmo et al., 2022; Timanikova et al., 2023).

O viroma de macroalgas ainda remanesce como campo pouco investigado, com a maior parte do conhecimento vigente na área demonstrando a identificação de elementos endógenos virais, genes marcadores ou em dados metagenômicos de “feovírus” da família *Phycodnaviridae* em diferentes espécies de macroalgas pardas. Funcionalmente, esses vírus infectariam essas algas pardas de forma persistente, integrando com êxito seu genoma ao desses hospedeiros, possivelmente se mantendo associado por todo seu ciclo de vida (Stevens et al., 2014; Schroeder; Mckeown, 2021). Um estudo recentemente publicado conciliando metagenômica funcional e experimentos com mesocosmos demonstrou que a feofícea *Saccharina japonica* albergava espécies virais únicas e altamente específicas, quase totalmente desconhecida, com papel crítico na homeostase do hospedeiro algal via infecções líticas-lisogênicas e carreando genes para biossíntese de folato. Notavelmente, esses vírus também teriam genes auxiliares para degradação de laminarina da parede celular algal e infectam bactérias autóctones após depósito do hospedeiro, abrindo brecha para a atuação da virosfera nesse holobionte na ciclagem do carbono oceânico (Zhao et al., 2024).

Enquanto as macroalgas já fornecem logo em suas superfícies um ambiente rico em nutrientes para essas comunidades microbianas, os microrganismos associados desempenham uma miríade de funções metabólicas, de defesa e de impacto no ciclo de vida de seus hospedeiros (**Figura 6**). Esses papéis abrangem desde a produção de metabólitos secundários com atividades antimicrobiana e antiincrustante, detoxificação de espécies reativas de oxigênio, degradação de polímeros e nutrientes

estruturais e secretados pelas macroalgas e ambientes circundantes, competição direta frente a potenciais colonizadores e patógenos oportunistas, produção de sinais químicos para assentamento das formas reprodutivas desses hospedeiros e secreção de fatores de promoção do crescimento/morfogênese das macroalgas (Hollants et al., 2013; Egan et al., 2013; Singh; Reddy, 2016; Saha et al., 2024).

Figura 6. Diagrama conceitual representativo das diversas funções desempenhadas pelos microrganismos no holobionte macroalga ao longo de seu ciclo de vida (representado por setas rosas), abrangendo desde a fase reprodutiva (liberação e fixação de esporos), passando pela morfogênese e crescimento, até as respostas fisiológicas adaptativas a estresses bióticos (como proteção contra patógenos e incrustações) e abióticos. As setas pretas representam os fluxos de nutrientes, metabólitos ou sinais trocados entre os microrganismos parceiros e a alga hospedeira (Adaptado de Saha et al., 2024).



Biologicamente, o microbioma de macroalgas marinhas consiste em uma fonte valiosa e ainda pouquíssimo visada de substâncias com atividades antimicrobiana, antibiofilme e antiincrustante, além de um arsenal de enzimas com múltiplas aplicações industriais (Martin et al., 2014; Busetti et al., 2017; Ren et al., 2022). De especial atenção, sobressaem-se as moléculas com atividade antivirulência já relatadas para membros da microbiota epifítica de diferentes espécies de macroalgas marinhas. Tais moléculas teriam um papel elementar na regulação dos mecanismos de sinalização celular entre o hospedeiro macroalga e as comunidades microbianas associadas e, portanto, poderiam ser aproveitadas para a procura por

novos agentes capazes de bloqueio da expressão do fenótipo de virulência em patógenos bacterianos multirresistentes, oferecendo caminhos para o desenvolvimento de fármacos com baixíssima probabilidade de surgimento imediato de resistência aos antimicrobianos (Tang & Zhang, 2014; Borges & Simões, 2019; Mena et al., 2020). O arsenal enzimático de microrganismos associados à macroalgas também merece atenção, com vários dos trabalhos concentrados na avaliação da produção de enzimas responsáveis pela degradação de polímeros por bactérias cultiváveis isoladas desses hospedeiros, particularmente carboidratos (Martin et al., 2015; Kumar et al., 2022; Nguyen et al., 2023).

1.3. ENZIMAS ATIVAS SOB CARBOIDRATOS (CAZymes)

As enzimas ativas em carboidratos (CAZymes, do inglês, “*carbohydrate-active enzymes*”) englobam diversas classes de enzimas responsáveis pela síntese, degradação e modificação de polissacarídeos complexos ou glicoconjugados (Drula et al., 2022). A classificação das CAZymes é realizada em função da homologia de sequências de aminoácidos dessas enzimas, iniciada com uma de suas classes, as glicosídeo hidrolases (GHs) no início da década de 1990 (Henrissat, 1991). Essa classificação logo foi estendida para as demais classes de CAZymes, culminando na criação e lançamento do CAZy (Coutinho et al., 1999), um banco de dados especializado *online* (<https://www.cazy.org/>) sobre sequência, bioquímica, estrutura e genômica das CAZymes estruturado em uma taxonomia própria, sendo constantemente atualizado pela comunidade acadêmica e integrado com outros bancos de dados biológicos primários (Drula et al., 2022). A *CAZypedia* (<https://www.cazypedia.org/>) inclui outro importante recurso criado no final dos anos 2000 para consistir em uma enciclopédia virtual com todo o léxico e reunião didática de informações-chave de todas as famílias e subfamílias de CAZymes, sob atualização frequente por curadores especialistas e integrada ao CAZy (CAZypedia consortium, 2018).

Em função de diferentes atividades catalíticas, as CAZymes são classicamente divididas em cinco classes: (1) glicosídeo hidrolases (GHs), encarregadas da hidrólise de ligações glicosídicas em polissacarídeos e oligossacarídeos, incluindo 190 famílias e com maior número descrito de CAZymes até o presente momento; (2) glicosiltransferases (GTs), enzimas envolvidas na síntese de ligações glicosídicas (e, conseqüentemente, di-, oligo- e polissacarídeos) a partir de moléculas de açúcares

fosforilados, reunindo 138 famílias; (3) polissacarídeo liases (PLs), capazes de clivagem de ligações glicosídicas por um mecanismo de beta-eliminação em polissacarídeos, totalizando 44 famílias; (4) carboidratos esterases (CEs) responsáveis pela remoção de grupos acetil ou outros grupos de polissacarídeos, abarcando atualmente 20 famílias; (5) enzimas com atividades auxiliares (AA), englobando polissacarídeos monooxigenases líticas dependentes de cobre (LPMO, do inglês, "*Lytic Polysaccharide Monooxygenase*") e enzimas redox atuantes em conjunto com as demais classes de CAZymes na degradação de lignina por oxido-redução, sendo cruciais para a biodegradação de biomassa vegetal, reunindo 17 famílias (Chettri et al., 2020; CAZy, 2025). Além disso, existem os módulos de ligação aos carboidratos (CBMs, do inglês "*carbohydrate-binding modules*"), que são regiões contíguas geralmente presentes como domínio estrutural de outra CAZyme cuja atividade é justamente o reconhecimento e ligação específica a outro carboidrato para a posterior gerar a atividade catalítica pela CAZyme (You et al., 2024; CAZy, 2024).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e análises genômicas, as famílias de CAZymes têm sido subdivididas em subfamílias para refletir diferenças sutis nas sequências e nas especificidades de substrato ou mecanismos catalíticos. Essas subfamílias permitem uma classificação mais refinada das CAZymes, especialmente em classes grandes e diversificadas, como as GHs e GTs. Essa classificação em subfamílias é especialmente útil para prever a função de enzimas recém-descobertas, uma vez que uma sequência em uma subfamília específica é mais provável de ter uma função similar às outras enzimas dessa subfamília (Goldman, S., Yang, K., Connor, C., 2021).

Estudos de genômica e metagenômica contribuíram para a elucidação da organização estrutural e expressão do repertório genético das CAZymes e metabolismo de carboidratos nos organismos produtores. Inicialmente encontrados de forma característica em genomas de membros do filo Bacteroidota em estudos de caracterização do microbioma humano (Koropatkin et al., 2012), foi realizada a descrição de *locus* de utilização de carboidratos (PULs, do inglês, "*polysaccharide utilization locus*"), regiões consistiam em operons extensos com todos os genes contíguos e co-localizados necessários para detecção, captura, transporte e degradação de carboidratos complexos. Primeiramente representado pelos sistemas de utilização de amido (SUS, do inglês, "*starch utilization system*") em *Bacteroidetes theaiotamicron*, o arquétipo de PUL compreenderia genes codificadores de proteínas

de ligação aos glicanos, transportadores do tipo TonB-dependentes e das CAZymes relacionados a despolimerização completa em intermediários do metabolismo central do carboidrato-alvo (Hemsworth et al., 2016; Wexler; Goodman, 2017).

Rapidamente, uma diversidade de PULs passaram a ser detectados em representantes microbianos de todos os três domínios da vida para uma variedade de carboidratos complexos (Grodin et al., 2017), com sua configuração variando amplamente e levando a questionamento da estrutura típica do arquétipo PUL. Mais recentemente foi proposto um modelo de estrutura mais simples mais representativo dessas regiões, agora denominadas *clusters* gênicos de carboidratos (CGCs, do inglês, “CAZyme *gene clusters*”), as quais seriam elementarmente compostas por três categorias de genes-chave codificadores: (1) das CAZymes; (2) dos fatores transcricionais; (3) e transportadores de sacarídeos. Genes adicionais com função de suporte podem ser encontrados em um CGC, desde que as três categorias de genes-chave estejam presentes (Huang et al., 2018; Zheng et al., 2023).

Nesse contexto de investigação do repertório genômico das CAZymes em microrganismos, cunhou-se o termo “CAZoma” para se referir a proporção de CAZymes codificadas no genoma de um organismo. O CAZoma é espécie-específico e sua caracterização estrutural e funcional pode fornecer informações relevantes do estilo de vida e adaptações ecofisiológicas do organismo produtor. Por exemplo, o CAZoma de organismos de vida livre comumente varia entre 1,0 a 5,0% das sequências codificadoras, enquanto que CAZomas extremamente reduzidos (<1,0%) são típicos de organismos intracelulares obrigatórios (Lombard et al., 2014; Jones et al., 2018).

Em bactérias heterotróficas marinhas, o conteúdo do CAZoma aparenta variar entre 2,0 a 5,0% (Boncan et al., 2018; Chernysheva et al., 2019), o que se faz coerente considerando que são as principais encarregadas da degradação de carboidratos complexos em ecossistemas oceânicos, via digestão da matéria orgânica complexa produzida em substratos de baixa massa molecular, com eventual retorno a atmosfera desse carbono fixado. Dentre os principais reservatórios de carboidratos em ambientes marinhos se sobressaem o fitoplâncton e, em especial, polissacarídeos estruturais da parede celular de macroalgas, tais como o ágar, alginato, carragenana e ulvana (Hehemann; Boraston; Czjzek, 2014).

Microrganismos planctônicos e associados a superfícies abióticas e uma diversidade de hospedeiros evoluíram para possuírem um arsenal de enzimas

eficientes no catabolismo desses polissacarídeos, principalmente GHs envolvidas na hidrólise de ligações α -(1,3) ou β -(1,4) no esqueleto de carbono do ágar e carragenana e de alginato liases e ulvana liases, PLs responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas β -(1,4) nas cadeias urônicas do alginato e ulvana, bem como sulfatases, cruciais para remoção de grupamentos sulfato tipicamente encontrados nesses açúcares e viabilização do acesso às ligações glicosídicas pelas CAZymes (Arnosti et al., 2021; Bäumgen et al., 2021; Hettle et al., 2022). Biotecnologicamente, enzimas depolimerizadoras de polissacarídeos marinhos atraem significativa atenção, notadamente para a obtenção de seus respectivos oligossacarídeos biologicamente ativos com uma gama de aplicações em diferentes indústrias e na produção de biocombustíveis diretamente da biomassa residual de macroalgas (Trincone, 2018; Sun et al., 2020).

1.4. AGARASES

As agaranas pertencem ao grupo das galactanas sulfatadas, uma ampla família de heteropolissacarídeos complexos notadamente encontrados na estrutura da parede celular de macroalgas rodofíceas. Essas galactanas são basicamente definidas por serem constituídas por unidades alternadas de (β 1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose e (α 1 $\rightarrow$ 4)-L-galactose e, de acordo com o padrão de substituição inicial, essa conversão pode fornecer o polissacarídeo neutro agarose ou derivados de agarose. A agarose é o principal componente dos produtos obtidos industrialmente principalmente de macroalgas marinhas das ordens *Gelidiales*, *Gracilariales* e *Ahnfeltiales*, e conhecido como “ágar” ou “ágar-ágar” (Pomin, 2010; Ciancia; Matulewicz; Tuvikene, 2020). Apesar do gel formado pelo ágar extraído do gênero *Gelidium* ser mais estável, as dificuldades enfrentadas em seu cultivo tornam a rodofícea *Gracilaria* como a principal fonte de ágar obtido para fins comerciais. Por esta razão, o ágar extraído de *Gelidium* é utilizado nas áreas bacteriológica e farmacêutica e o ágar de *Gracilaria* é o preferido pela indústria alimentícia (Porse; Rudolph, 2017).

Com sua utilização datada do século XVII no Japão para gelificação de alimentos, esse ficocoloide se popularizou no Oriente e restante do mundo principalmente entre meados para o final do século XIX, bem ilustrados pela adoção na produção direta de certos alimentos e com a sua introdução revolucionária em microbiologia para solidificação de meios de cultura bacteriológicos por Fanny Angelina Hesse (Padmesh; Sing, 2021; Nai, 2024). Atualmente, o ágar é amplamente utilizado em

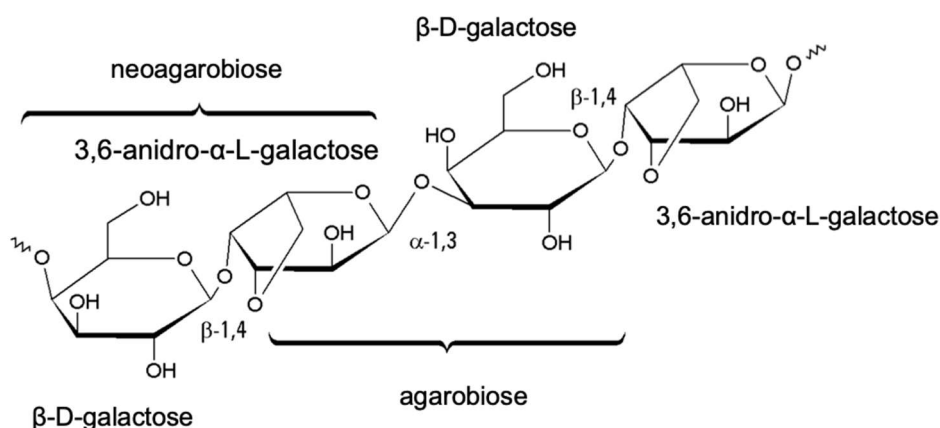
vários setores industriais, em especial devido a capacidade das cadeias de galactanas lineares formarem hélices via ligações de hidrogênio de excelente reversibilidade, ocasionando na formação de um gel com estabilidade e histerese, além de sua biocompatibilidade, rápida biodegradabilidade e baixa viscosidade, altamente vantajosa para o preparo de formulações, estabilizantes, espessantes, hidrogéis e filmes (Jiang et al., 2023; Lomartire & Gonçalves, 2023).

Dentre os principais empregos atuais do ágar e agarose, destacam-se na indústria alimentícia em panificação, produtos lácteos e derivados, produtos vegetais e dietéticos (Menon, 2011), na indústria farmacêutica como laxante e excipiente de de pílulas, comprimidos e xaropes e na formulação de sistemas de entrega de fármacos e filmes antimicrobianos (Shahruzzaman et al., 2019), no setor biomédico em engenharia de tecidos e produção de curativos de feridas (Zarrintaj et al., 2018), além de sua aplicação como agente solidificante de meios de cultura e preparo de géis de eletroforese em microbiologia e biologia molecular, respectivamente (Song; Shang; Ratner, 2012). O mercado global de ágar foi avaliado em US\$ 275,36 milhões em 2023 e está projetado para atingir US\$ 375,23 milhões até 2030, crescendo a uma taxa anual composta (CAGR, do inglês, “*compound annual rate growth*”) de 4,52% de 2024 a 2030 (Maximize Market Research, 2025).

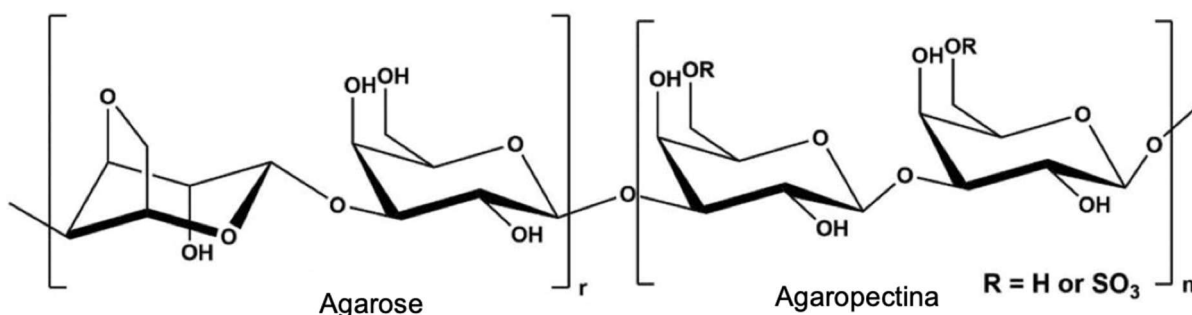
A estrutura química do ágar se caracteriza pela presença de dois polissacarídeos: a agarose e a agarpectina (**Figura 7**). A agarose consiste em um polímero linear neutro, de alta massa molecular (>100 kDa) composto por unidades básicas de repetição de um dissacarídeo de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (AHG, do inglês “*anhydrogalactose*”). A depender da direção da ligação O-glicosídica, essa unidade dissacarídica pode se apresentar como agarobiose, quando a ligação é $\alpha(1\rightarrow3)$, e neoagarobiose quando a ligação é $\beta(1\rightarrow4)$. Apesar de seguir esse padrão estrutural primário da agarose, a agarpectina difere por ter uma massa molecular menor (<20 kDa) e um conteúdo de sulfato muito elevado, variando entre 5,0 a 8,0%, o qual não ultrapassa 0,15% na agarose. Ademais, a agarpectina é enriquecida em outros grupos substituintes, tais como metil, piruvato e acetato, o que contribui para aumentar sua carga aniônica em pH 7,0. Tal carga global negativa da agarpectina afeta no estabelecimento das ligações de hidrogênio nas hélices altamente estáveis do ágar no processo de sua solidificação e, conseqüentemente, acaba tornando desafiadora a sua extração a partir da biomassa bruta algal (Layahe; Rochas, 1991; Usov, 2011; Ciancia; Matulewicz; Tuvikene, 2020).

Figura 7. Estrutura química do ágar: (a) unidades de repetição na cadeia linear de agarose: agarobiose com a ligação O-glicosídica α (1 $\rightarrow$ 3) e neoagarobiose com a ligação O-glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4); (b) agarose e agarpectina, com a potencial presença dos grupamentos sulfato na agarpectina (Adaptado de: Bertasa et al., 2017; Torres; Flórez-Fernández; Domínguez, 2019).

(a)



(b)



Após pré-tratamento com solventes alcalinos em altas temperaturas da biomassa bruta de rodófitas em processo com alto desperdício de água (Sousa et al., 2012), existem duas rotas principais para despolimerização da agarose gerada. A primeira é a liquefação química, envolvendo a hidrólise do polímero com ácidos a qual atuando majoritariamente nas ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 3) com a geração principal de produtos oligossacarídeos de agarobiose com o resíduo de AHG na extremidade redutora, os agaroligossacarídeos (AOs). Essa hidrólise ácida pode ocorrer em condições moderadas, como as com baixas concentrações de ácidos, baixas temperaturas e tempos de reações mais curtos predominantemente resultam na liberação inicial de AOs com nível de polimerização par. Todavia, resíduos de AHG na extremidade redutora são suscetíveis ao ataque ácido, ocasionando na formação

de AOs com nível de polimerização ímpar. A degradação de açúcares durante a hidrólise química leva a baixa produção de açúcares monoméricos e para sua obtenção pode ser aplicada a segunda principal rota, o tratamento enzimático (Yun; Yu; Kim, 2017).

A hidrólise enzimática do ágar se dá pela ação de um conjunto de GHs capazes de atuar no polissacarídeo em variados níveis de polimerização, as agarases. Os principais produtos da despolimerização enzimática são oligossacarídeos de neogarobiose com galactose na extremidade redutora, os neoagaroligossacarídeos (NAOs). Esses geralmente são produzidos aos pares, além do tratamento enzimático ser eficiente na geração de altos níveis de AHG devido a elevada especificidade aos substratos dessas enzimas (Kim et al., 2017). No processamento enzimático, faz-se imprescindível uma maior termoestabilidade dessas enzimas, uma vez que a reação enzimática precisa ocorrer a uma temperatura acima da transição solução-gel da agarose, especialmente porque a forma em gel é muito menos acessível do que as formas solubilizadas. Ademais, várias enzimas agarolíticas são necessárias para a hidrólise completa do polímero até os resíduos de açúcares monoméricos, como AHG e β -D-galactose e, assim, são necessárias sua aplicação conjunta em processos de extração com esses biocatalisadores (Yun; Yu; Kim, 2017).

Uma associação entre a inicial liquefação química sucedida de hidrólise enzimática tem sido defendida, uma vez que seria circunsrita ambas as desvantagens do emprego dessas rotas de forma isolada. Com o uso de ácidos fracos ou Tris-HCl, a agarose seria preferencialmente pré-hidrolisada em suas ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ em AOs, os quais poderiam ser finalmente depolimerizados em NAOs ou neoagarobiose e, em seguida, AHG e β -D-galactose por enzimas agarolíticas. Esse processo integrado seria mais complexo, uma vez que demandaria por diferentes agarases, todas com alta estabilidade térmica e físico-química para atuação em reações enzimáticas múltiplas, sendo necessária otimização da estratégia para sua ampla incorporação em um cenário industrial (Kim et al., 2018; Jiang et al., 2020). Uma rota mais econômica e menos danosa ao meio ambiente sugerida como alternativa seria através de hidrólise hidrotérmica de agarose assistida por micro-ondas, com oligossacarídeos liberados sob condição otimizada de 160 °C por 25 minutos com liquefação completa do polissacarídeo (Dan et al., 2022). Tal abordagem já foi conciliada com êxito com uso de enzima agarolítica da bactéria de origem marinha *Saccharophagus degradans* para geração controlada, em menor tempo e menos custosa de AOs e

monossacarídeos, além de detecção de atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, ilustrando a eficácia do processo integrado na geração de AOs bioativos (Shen et al., 2023).

As agarases são divididas em duas classes em função do padrão de clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\beta(1\rightarrow4)$. As α -agarases (EC 3.2.5.1.158) catalisam a hidrólise de ligações $\alpha(1\rightarrow3)$, tendo como produtos principais os AOs. As β -agarases (EC 3.2.1.81) hidrolisam ligações $\beta(1\rightarrow4)$, liberando os NAOs. Ainda em relação ao perfil do produto e especificidade dos seus substratos, as agarases podem ser classificadas em endolíticas e exolíticas, onde produzem neoagarotetraose e neoagarobiose como seus produtos principais de hidrólise, respectivamente. As endoagarases geralmente atuam internamente na cadeia polissacarídica, enquanto a exoagarases clivam nas extremidades (Michel; Czjzek, 2013; Hehemann; Boraston; Czjzek, 2014; Veerakumar; Manian, 2018).

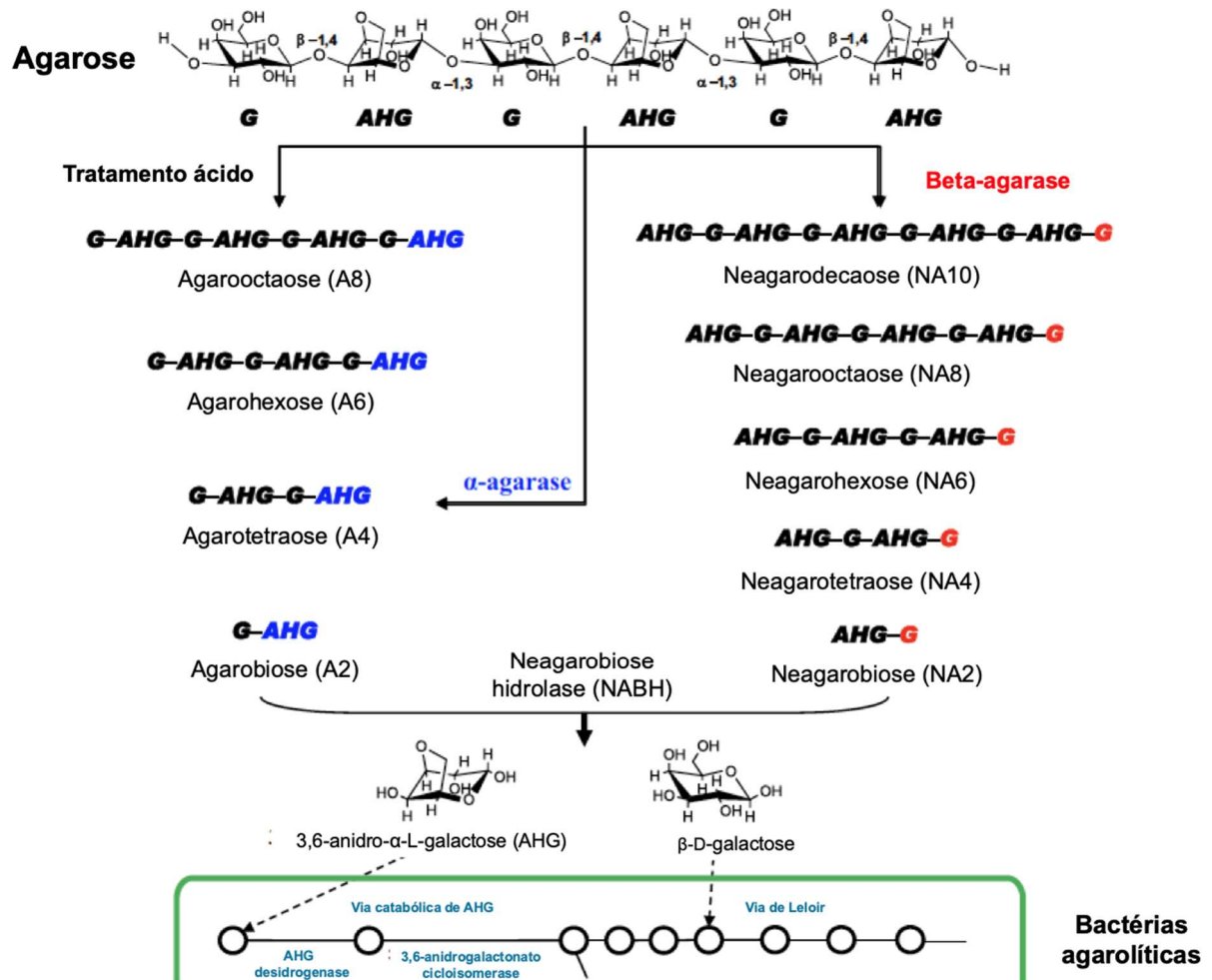
Presentemente, todas α -agarases estão alocadas na família de GH96, com apenas seis caracterizadas bioquimicamente, todas endolíticas com agarotetraose como principal produto de hidrólise. Já as β -agarases estão distribuídas em seis famílias de GH diferentes: GH16, GH39, GH50, GH86 e GH118. As famílias de GH 50 e 118 são monoespecíficas, contendo apenas β -agarases majoritariamente exolíticas e com agarose como substrato exclusivo. Em contrapartida, as famílias de GH 16, 39, 42 e 86 são poliespecíficas e muito heterogêneas, possuindo atividades enzimáticas diversas e com as enzimas agarolíticas concentradas em algumas subfamílias (Veerakumar; Manian, 2018; Viborg et al., 2019; Park, Lee, Hong, 2020). Atualmente, as famílias de GH16 e GH50 concentram a maior parte das agarases caracterizadas bioquimicamente, com 44 e 37 representantes, respectivamente. Ambas as famílias também incluem as agarases com estrutura tridimensional já plenamente determinada, estando disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês, “*Proten Data Bank*”) sete endo- β -agarases GH16 e quatro exo- β -agarases GH50 até o presente momento (CAZy, 2025).

As enzimas agarolíticas foram principalmente isoladas e descobertas em habitats marinhos, majoritariamente bactérias isoladas da água do mar, sedimento e da superfície de hospedeiros marinhos, como algas, esponjas, moluscos e, em menor extensão, do solo e amostras de água doce (Fu; Kim, 2010; de Oliveira et al., 2021). Uma parte considerável dos produtores microbianos dessas enzimas são bactérias da classe Gammaproteobacteria do filo Pseudomonadota: *Alteromonas*,

Pseudoalteromonas, *Microbulbifer*, *Saccharophagus*, *Agarivorans*, *Aligarivorans*, *Marinagarivorans*, *Catenovulum*, *Thalassomonas*, *Gayadomonas*, *Simiduia*, *Cellvibrio*, *Vibrio*, *Shewanella* e alguns exemplos em *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. No filo Bacillota, sobressaem-se os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Cohnella*, enquanto o gênero *Alterococcus* do filo Verrucomicrobia já foi relatado como eventual produtor dessa enzima (Chi; Chang; Hong, 2012; Jahromi; Barzkar, 2018; Zhu et al., 2019). Em relação ao filo Bacteroidota, um número de β -agarases já foram descritas em alguns gêneros, com destaque a *Zobellia*, com atenção ao um modelo de bactéria agarolítica, *Zobellia galactonivorans* (Martin et al., 2014; Wilkens et al., 2018) e *Bacteroides*, particularmente certas espécies encontradas no microbioma intestinal humano, *Bacteroides uniformis* (Pluvinau et al., 2018) e *Bacteroides plebeius* (Giles et al., 2017; Park et al., 2021).

O catabolismo microbiano da agarose envolve uma série de etapas enzimáticas comuns (**Figura 8**), com a agarose inicialmente submetida a ação de α - ou β -agarases, gerando AOs e NAOs, respectivamente. As β -agarases das famílias de GHs 16 e 86 são responsáveis pela degradação primária das hélices da agarose em NAOs com diferentes comprimentos de cadeia (neagarotetraose, neoagarohexose e neoagaroctose), substratos mais facilmente hidrolisáveis pelas α -agarases da família GH50, liberadoras de neoagarobiose. Tanto nesse dissacarídeo e na agarobiose, produzido pelas α -agarases, a ligação $\beta(1\rightarrow4)$ é rompida por neoagarobiose hidrolases (NABH) (EC 3.2.1.159), α -agarases da família de GH117. A D-galactose gerada pode ser prontamente transformada no intermediário glicolítico glicose-6-fosfato. Em contrapartida, o AHG pode ser convertido em duas etapas enzimáticas descritas primeiramente no gênero *Vibrio* em 2-ceto-3-deoxi-L-galactonato (K-DGal), intermediário direcionado para o metabolismo do galactonato e, subsequentemente, vias energéticas centrais (Park; Lee; Hong, 2020; Jiang et al., 2020; Yu et al., 2022). Essa via alternativa de incorporação do AHG liberado pela ação agarolítica aparenta ser mais conservada do que se previa, tendo sido detectada *in silico* nos genomas e caracterizada funcionalmente em bactérias simbiotes de esponjas marinhas (de Oliveira et al., 2021) e do microbioma intestinal humano (Yun et al., 2021).

Figura 8. Hidrólise enzimática do ágar. Com exceção de G (referente à galactose), todas as demais abreviaturas e detalhes estão devidamente apresentados e discutidos acima (Adaptado de Park; Lee; Hong, 2020).



As agarases têm uma ampla variedade de aplicações promissoras em diferentes setores industriais, tendo sido amplamente utilizadas como parte de *kits* comerciais de laboratório para recuperação de ácido desoxirribonucleico (DNA) do gel de agarose, da melhoria dos processos extrativos modernos a partir da parede celular de algas para estudos de fisiologia e citologia desses organismos, e, mais especialmente, na hidrólise do ágar para produção de oligo- e monossacarídeos (Fu; Kim, 2010). De modo geral, enzimas agarolíticas são comumente expressas em sua forma recombinante, com a maioria bioquimicamente caracterizada até o momento possuindo atividade ótima em pH neutro ou levemente alcalino, além de estabilidade entre 30°C a 50°C. A maior parte do interesse ainda está concentrado no isolamento de β-agarases por causa da baixa atividade e produtividade de α-agarases até então descritas (Jahromi; Barzkar, 2018; Veerakumar; Manian, 2018), apesar de já ter sido relatado que essas enzimas podem exibir propriedades interessantes para emprego em um contexto industrial, tais como atividade em pH alcalino, psicrotolerância,

adicionalmente a geração de AOs com diferentes níveis de polimerização (Lee et al., 2019; You et al., 2023; Zeng et al., 2024).

Tomando como ponto de partida o conceito de biorrefinaria, ou seja, a conversão de biomassa em produtos de alto valor agregado e biocombustíveis, diferentes CAZymes tem surgido como recursos interessantes no reaproveitamento sustentável de resíduos de algas em um contexto de economia circular (Chettri; Verma; Verma, 2020; Zhang; Zhang; Verma, 2021). Nesse contexto, rodofíceas podem consistir em matéria-prima renovável valiosa para produção de biocombustíveis de terceira geração. Processos da pré-hidrólise química de biomassa de macroalgas vermelhas acoplados à sua sacarificação com enzimas agarolíticas já foram verificados como mais vantajosos na obtenção de açúcares fermentáveis da agarose (Yun; Choi; Kim, 2015; Yun et al., 2016; Lara et al., 2020). Consecutivamente, hidrolisados de agarose com esses monossacarídeos liberados poderiam ser incorporados em condições fermentativas para a geração de etanol (Kim et al., 2013; Goda et al., 2024) e, até mesmo, bio-hidrogênio (Wu et al., 2017). Praticamente todas as enzimas da via agarolítica são cruciais nesses processos, incluindo a NABH, responsável pela geração dos monômeros de galactose e AHG a partir de neoagarobiose e/ou agarobiose. Em especial, a sacarificação completa de AHG e ambos enantiômeros de K-DGal também vêm ganhando espaço como precursores de substâncias passíveis de conversão em produtos da química fina, surfactantes, aditivos alimentares, cosméticos, biopolímeros, biofármacos, indutores da degradação de pectina (Kim et al., 2020; Yun et al., 2024).

Mais recentemente, AOs e NAOs liberados pelas agarases têm recebido uma atenção em vista da multiplicidade de atividades fisiológicas e farmacológicas benéficas para a saúde humana, incluindo propriedades anti-inflamatórias, prebióticas, antioxidantes, carcinostáticas, hepatoprotetoras, anti-diabéticos, imunomoduladoras e de clareamento e hidratação da pele. Seus derivados ainda podem ser empregados para confecção de próteses dentárias e moldagem de outros materiais odontológicos (Park; Lee; Hong, 2020). Portanto, oligossacarídeos resultantes da ação agarolítica podem particularmente valiosos nas indústrias farmacêutica, cosmética, cosmecêutica e nutracêutica, alimentícia. A produção de uma variedade de NAOs farmacologicamente ativos já foi confirmada majoritariamente por β -agarases das famílias GH16 e GH50 em associação ou com

NABH recombinantes de diferentes gêneros de bactérias marinhas heterotróficas (Chen et al., 2021; Jiang et al., 2021).

2. HIPÓTESE

Determinar se bactérias associadas a macroalgas marinhas no litoral fluminense possuem a capacidade de produzir agarases.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Rastrear a produção de agarases por bactérias associadas a macroalgas marinhas coletadas no litoral do estado do Rio de Janeiro (RJ, Brasil).

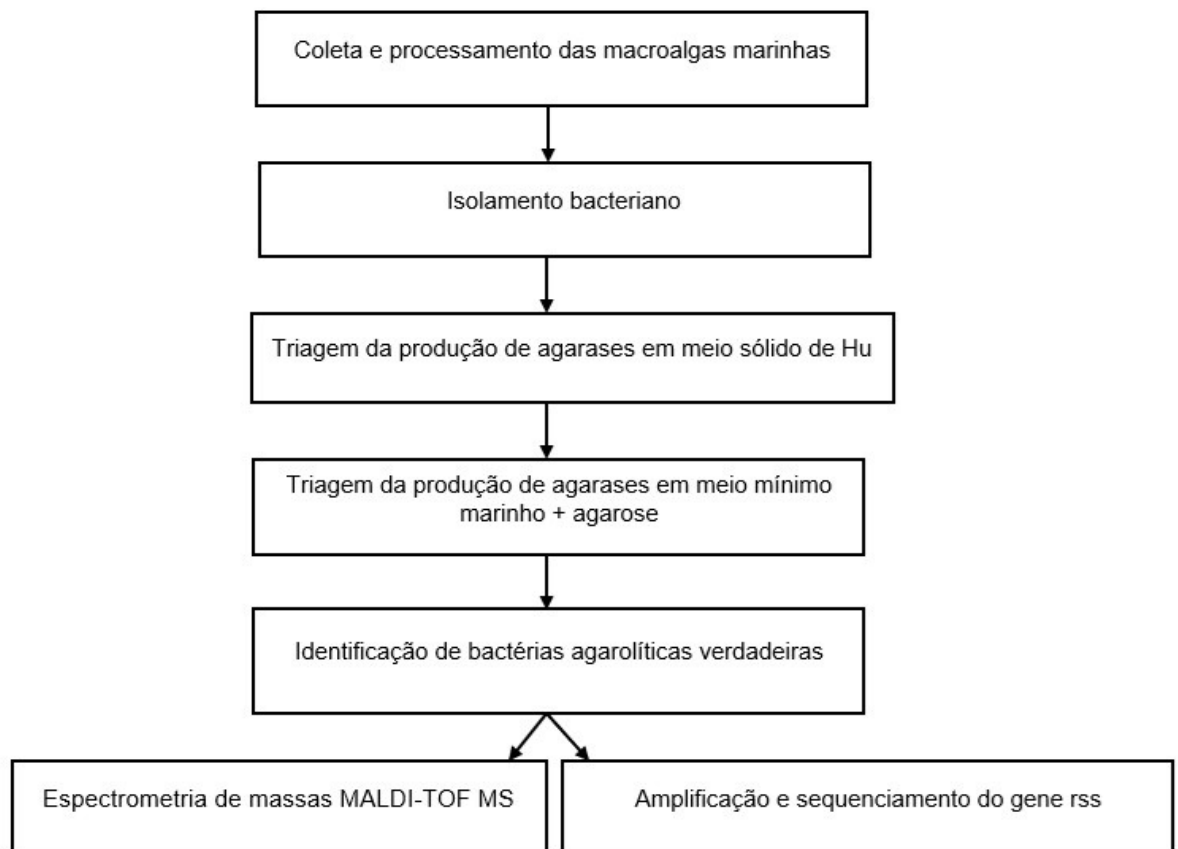
3.2. Objetivos específicos

- Coletar espécimes representativos de gêneros/espécies de macroalgas rodofíceas, feofíceas e rodofíceas em cidades litorâneas no estado do Rio de Janeiro;
- Isolar bactérias da microbiota cultivável das macroalgas marinhas coletadas em diferentes meios de cultura e sob as abordagens clássica e de enriquecimento;
- Rastrear a produção de agarases pelas bactérias associadas às macroalgas marinhas coletadas;
- Identificar bactérias agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de rastrear a produção de agarases em bactérias isoladas de macroalgas marinhas no litoral fluminense, as abordagens descritas foram sintetizadas no fluxograma a seguir:

Figura 9. Fluxograma das principais etapas da metodologia do presente estudo.

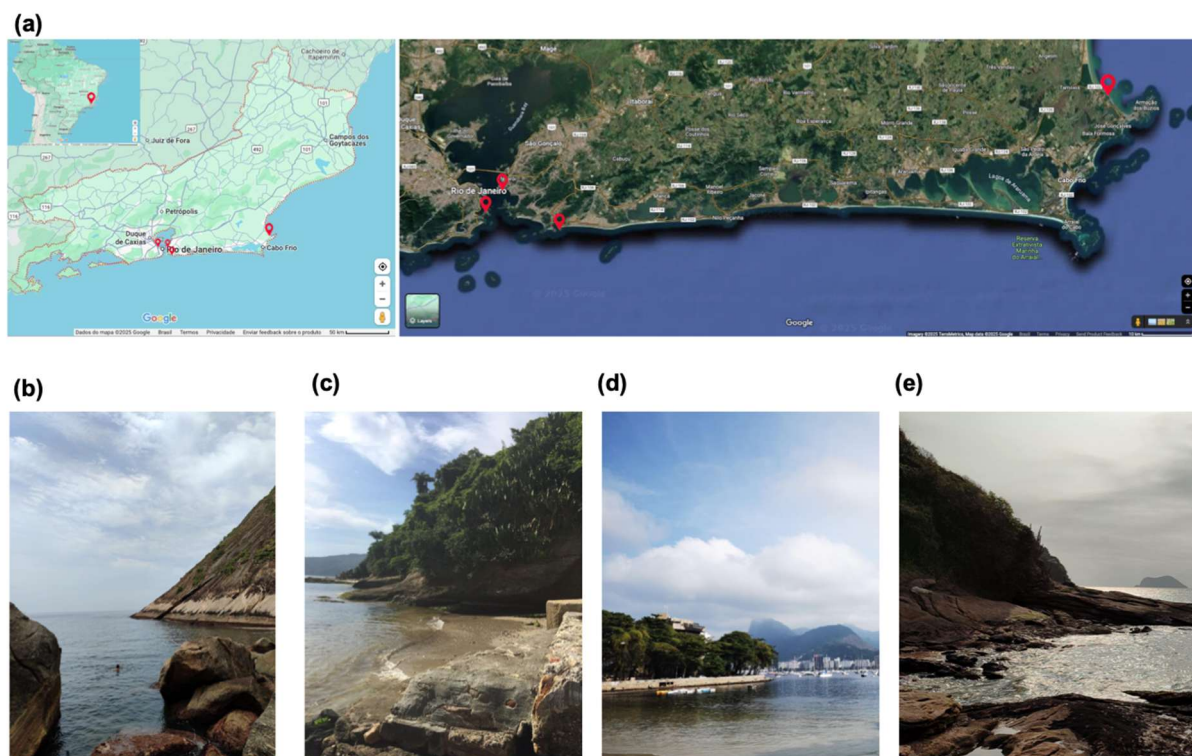


A maior parte experimental do estudo foi desenvolvido entre os meses de abril de 2023 a março de 2025 nos laboratórios de pesquisa do Núcleo de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) do Instituto Biomédico (CMB) da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde atualmente o Laboratório de Bacteriomas Marinhos ainda está integrado. A coleta das amostras de macroalgas no litoral das cidades do estado do Rio de Janeiro envolveu a participação de pesquisadores colaboradores do Departamento de Biologia Marinha (GBM) do Instituto de Biologia (EGB) da UFF e do Departamento de Invertebrados do Museu Nacional (MN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Parte do processamento e do isolamento bacteriano dos espécimes coletados de macroalgas marinhas assim como a identificação molecular das amostras bacterianas com perfil agarolítico foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha (BMM14) do Departamento de Microbiologia Médica (DMM) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.1 COLETA DOS ESPÉCIMES DE MACROALGAS MARINHAS

Entre os anos de 2023 e 2024, foram realizadas seis expedições de coletas no litoral de três cidades do estado do Rio de Janeiro (RJ): Rio de Janeiro, com uma coleta de espécimes de *Ulva* na Praia da Urca ($-22^{\circ} 94' 72.00''\text{O}$, $-43^{\circ} 16' 31.90''\text{S}$) em junho de 2023; Armação de Búzios, com duas coletas de *Codium*, *Laurencia* e *Ulva* na Praia Rasa ($-22^{\circ} 44' 1.31''\text{S}$, $41^{\circ} 57' 27.12''\text{O}$) em julho de 2023 e agosto de 2024; Niterói, com três coletas, sendo duas coletas de espécimes de *Sargassum* na Enseada do Bananal no Parque Estadual da Serra da Tiririca (PESET) em janeiro de 2023 e 2024 e uma coleta de espécimes de *Ulva* na Praia da Boa Viagem ($-22^{\circ} 90' 82.55''\text{O}$, $-43^{\circ} 13' 01.42''\text{S}$) em janeiro de 2023. Com auxílio da tábua de marés na confirmação das condições ideais para a coleta, as expedições foram conduzidas sob a maré baixa de profundidade (máximo de até 1,5 metros), facilitando a recuperação direta dos espécimes de macroalgas através na superfície rasa ou de mergulho livre. Particularmente, em locais de costões rochosos (Enseada do Bananal) e mais distantes da costa ($> 250\text{ m}$; Praia Rasa), foram utilizados equipamentos de mergulho autônomo e para auxílio na coleta das macroalgas. Em particular para a coleta em Área de Proteção Ambiental (APA) como a PESET na costa de Niterói, as expedições foram realizadas com a documentação de licença para as coletas do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (nº do documento: 85571-1 e 85571-2).

Figura 10. Mapa do estado do Rio de Janeiro com locais de coleta indicados e as respectivas fotos obtidas nos dias das expedições das coletas : (a) mapa geral do estado do Rio de Janeiro com foco na costa e respectivos locais de coleta destacados com ícones de pinos em vermelho (Fonte: *Google Maps*); (b) Enseada do Bananal (Niterói, RJ); (c) Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ); (d) Praia da Urca (Rio de Janeiro, RJ); (e) Praia Rasa (Armação dos Búzios, RJ) (Fonte: Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira).



Inicialmente, todas as macroalgas observadas foram avaliadas visualmente, segregando os indivíduos com as características fenotípicas dos prováveis táxons de interesse de acordo com o local de coleta. Após isso, cada uma delas foram lavadas vigorosamente por três vezes consecutivas durante 30 segundos com água do mar artificial (ASW, do inglês, “*artificial seawater*”) esterilizada para a retirada de microrganismos transitórios e não associados às superfícies desse organismo, além de detritos e outros (macro)organismos eventualmente associados às macroalgas. Em seguida, cada uma das amostras foi transferida para o interior de sacos plásticos esterilizados com aproximadamente 250 mL de ASW esterilizada, os quais foram armazenados em caixas térmicas com gelo com uma temperatura entre 2°C a 8°C e imediatamente transportadas para processamento e isolamento bacteriano no laboratório.

4.2. ISOLAMENTO BACTERIANO DAS MACROALGAS MARINHAS COLETADAS

Após a chegada no laboratório, os espécimes de macroalgas coletados foram separados para facilitar posterior processamento para isolamento bacteriano. Conforme ocorreu a retirada das amostras das respectivas caixas térmicas, cada uma

delas foram novamente lavadas com ASW esterilizada e transferidas em placas de Petri identificadas e pré-esterilizadas para processamento.

Em todas as amostras coletadas foram realizados tanto o processo de isolamento bacteriano da microbiota epifítica, quanto o isolamento da microbiota total. Para a microbiota epifítica, foram utilizados *swabs* esterilizados em toda a superfície da macroalga e recuperar o máximo de bactérias ali associadas. Em seguida, os *swabs* foram transferidos, para soluções contendo 10 mL de ASW esterilizada em tubos Falcon de 15 mL. Com relação a microbiota total, a macroalga após passagem dos *swabs* para isolamento da microbiota epifítica foi então fragmentada com bisturis esterilizados para facilitação da maceração, gerando assim, fragmentos de macroalgas com aproximadamente 1,0 cm². Após isso, os fragmentos foram coletados com uma pinça, inseridos em um tubo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de ASW e macerados com auxílio de bastão de vidro pré-esterilizados. Os extratos gerados para cada amostra foram então homogeneizados vigorosamente por aproximadamente 5 minutos.

Tanto as soluções de ASW com os *swabs* das microbiotas epifíticas quanto os extratos derivados da maceração das macroalgas homogeneizadas da microbiota total foram diluídos em ASW, com uma proporção inicial de 10⁰ mL (100 µL das soluções mais 900 µL de ASW). A partir disso, foi executada diluição seriada das soluções de ASW derivada da microbiota epifítica entre 10⁻¹ e 10⁻³. Nas soluções dos extratos da microbiota total a diluição seriada também foi realizada, em uma escala variando entre 10⁰ e 10⁻⁵.

Em seguida, alíquotas de 100 µL das diluições de 10⁻¹ e 10⁻² das soluções derivadas da microbiota epifítica e 100 µL das diluições de 10⁰ até 10⁻⁵ das diluições dos extratos da microbiota total foram semeadas pela técnica de espalhamento na superfície de um painel de meios de cultura para o isolamento das bactérias associadas às macroalgas marinhas: meio Marine de Zobell 2216 (Becton Dickinson Difco™, EUA), meio Marine diluído a um décimo da força (Marine 1:10), meio mínimo marinho (MMM) (Thomas et al., 2016) suplementado com ágar a 1,5% (m/v), agarose a 1,0% (m/v), alginato de sódio a 1,0% (m/v), ou óleo mineral (1,0%, v/v), Luria-Bertani (LB) suplementado de 3,0% de NaCl e 10 mM de NH₄Cl (YOUNKER et al. 2024), e amido-caseína (AC). Com exceção do MMM acrescido com ágar, agarose e alginato supracitados, todos os meios citados foram solidificados com ágar bacteriológico a 1,5% (m/v) e suplementados com anfotericina B a uma concentração final de 1,0

$\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich, EUA) para evitar o crescimento fúngico indesejado. Após isso, o material foi incubado a 28°C com monitoramento diário durante 7 dias observando o crescimento das unidades formadoras de colônias (UFCs).

Adicionalmente, uma estratégia de enriquecimento foi adotada nas coletas na Enseada do Bananal de janeiro de 2024 e Armação de Búzios em setembro de 2024 para isolamento seletivo de bactérias consumidoras dos polissacarídeos-chave dos espécimes de macroalgas marinhas (Kandasamy et al., 2020). Brevemente, os fragmentos derivados das amostras de macroalgas foram transferidos para 100 mL de MMM acrescidos de 0,2% (m/v) de agarose (*Rhodophyta*), ou 0,2% de alginato de sódio (*Phaeophyceae* e *Chlorophyta*), além de anfotericina B ($1,0 \mu\text{g/mL}$). Consecutivamente à incubação a 28°C sob agitação (150 rpm) por até 72 h, alíquotas de 100 μL das culturas de enriquecimento foram diluídas em solução de MMM e as diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas em ágar MMM suplementado com seu respectivo polissacarídeo e, posteriormente, purificadas em ágar Marine conforme supracitado.

Após o plaqueamento, todas as placas foram mantidas sob incubação a 28°C com monitoramento diário por até 7 dias, duas a três UFCs do mesmo morfotipo bacteriano foram selecionadas, purificadas em ágar Marine e, então, estocadas em glicerol a 20% (v/v) com armazenamento a -20°C .

4.3. TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE AGARASES PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS

As bactérias isoladas dos espécimes de macroalgas foram investigadas quanto a sua atividade agarolítica utilizando o meio de Hu, consistindo basicamente de ASW e ágar a 1,5% (m/v) (Hu et al., 2009). Com esse propósito, as amostras bacterianas estocadas em glicerol a 20% (v/v) foram reativadas em caldo Marine e cultivadas a 28°C por até 48 horas sob agitação a 130 rpm. Alíquotas de 10 μL das culturas bacterianas em fase exponencial de crescimento foram semeadas sob o aspecto puntiforme no meio de Hu, seguido de incubação a 28°C de 24 a 72 horas com acompanhamento diário. Para detectar a atividade agarolítica das bactérias, foi necessário aplicar uma solução de lugol (Isofar, Brasil) a 1,0% (v/v) sob a superfície do meio de Hu. A interpretação dos resultados foi conduzida em conformidade com o aparecimento de uma zona clara em torno do crescimento puntiforme bacteriano, evidenciando a degradação do substrato ágar presente no meio, em contraste com a

coloração escura do restante do meio não hidrolisado devido a formação de complexos macromoleculares entre o iodo da solução de lugol e o polissacarídeo-alvo não hidrolisado.

O potencial enzimático das bactérias observadas foi estipulado com base no cálculo do Índice Enzimático [(IE) = diâmetro da zona de hidrólise/diâmetro da massa puntiforme bacteriana]. Foram consideradas como potenciais produtores da exoenzima apenas as bactérias para as quais foram observadas um valor de IE igual ou maior a 2,0 (Hankin; Anagnostakis, 1975). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos valores de IE para cada bactéria isolada das macroalgas marinhas consideradas.

As bactérias com valores de IE $\geq$ a 2,0 foram selecionadas para a triagem de atividade agarolítica em o meio mínimo marinho (Thomas et al., 2016) suplementado com 1,0% (m/v) de agarose (Kavsi, Brasil). Alíquotas de 10 μ L dos estoques das estirpes bacterianas potencialmente agarolíticas em glicerol a 20% (v/v) foram diretamente semeadas sob o aspecto puntiforme no MMM adicionado de agarose a 1,0% seguido de incubação a 28°C de 24 a 72 horas com monitorização diária. A presença de atividade agarolítica foi revelada mediante adição de solução de lugol a 1,0% (v/v) sob a superfície do meio conforme anteriormente detalhado. Os experimentos descritos acima foram realizados em triplicata, com cálculo do IE para todas as estirpes potencialmente produtoras da exoenzima, conforme descrito acima.

Durante todo o processo de isolamento das bactérias associadas às macroalgas marinhas e a triagem de atividade agarolítica, foi observado possíveis depressões no meio de cultura. Caso houvesse depressão promovida pela estirpe bacteriana em pelo menos uma dessas etapas de triagem associada com manutenção da atividade agarolítica em meio sólido, a estirpe bacteriana marinha em questão foi considerada uma estirpe agarolítica verdadeira.

4.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS MACROALGAS MARINHAS

As bactérias isoladas das macroalgas marinhas foram encaminhadas para identificação molecular por espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês, “*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*”). Para preparo das amostras bacterianas para a espectrometria de

massas, as culturas foram depositadas (em duplicata) em áreas delimitadas de uma placa de aço polido (96 MSP – Bruker Daltonics, EUA), individualmente tratadas com ácido fórmico e solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e submetidas ao espectrômetro de massas MALDI-TOF Micro Flex LT (Bruker Daltonics) da Plataforma de Identificação Microbiana do IMPG/ UFRJ. Os espectros de massas gerados foram processados no *software* Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics) com consecutiva comparação com o banco de dados de estirpes de referência. Com base nos valores de *scores* gerados, a identificação bacteriana foi considerada com confiabilidade a nível de espécie com score ≥ 2.000 , confiança à nível de gênero no intervalo entre 1.999 – 1.700, e insuficiente para identificação < 1.699 . Uma estirpe de *Escherichia coli* DH5 α foi adotada como calibrante e controle.

4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS POTENCIAIS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AGARASES ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS

Para identificar molecularmente as potenciais bactérias agarolíticas selecionadas pelo valor de IE obtido, foram utilizadas as técnicas de amplificação e sequenciamento do gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossômico (rRNA). A obtenção do DNA bacteriano foi realizada por lise térmica em associação com a inserção de resina quelante Chelex® 100 (Walsh; Metzger; Higuchi, 1991) seguido da amplificação do gene codificador do 16S rRNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- GGYTACCTTGTTAACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). As seguintes condições de amplificação foram adotadas: em uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 6 min, seguida por 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min 30 s e 72 °C por 2 min 30 s, e uma etapa de alongamento final a 72 °C por 5 min (Laport et al., 2017). Os produtos derivados pelo PCR com tamanhos de aproximadamente 1,4 kb foram enviados para o sequenciamento automático de Sanger com o emprego do iniciador 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') (Huse et al., 2008).

Todos os materiais obtidos das sequências gênicas bacterianas serão ainda avaliados quanto à sua qualidade no *software* Chromas 2.6.6 e submetidos a pesquisa para identificação taxonômica na ferramenta SINA, associado ao repositório integrado de banco de dados de sequências ribossomais do SILVA (Pruesse e et al., 2007) e BLASTn (Altschul e et al., 1990) junto ao banco de sequências representativas de 16S rDNA de *Bacteria* e *Archaea* do GenBank do Centro Nacional de Informações sobre

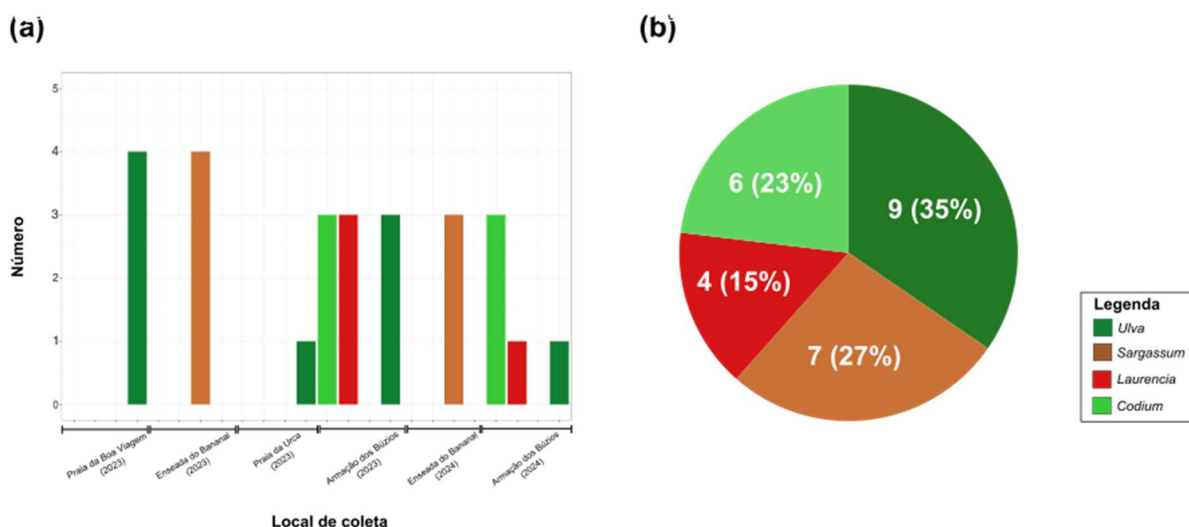
Biociencia (NCBI, do inglês, “*National Center for Biotechnology Information*”). Ao término, as sequências do gene codificador do 16S rRNA serão devidamente anexadas no banco de dados *GenBank*.

5. RESULTADOS

5.1. COLETAS DAS MACROALGAS MARINHAS

A partir das seis coletas realizadas durante os anos de 2023 e 2024, foram recuperados 26 espécimes de macroalgas marinhas abrangendo os gêneros *Ulva* (Chlorophyta), *Sargassum* (Phaeophyceae), *Laurencia* (Rhodophyceae) e *Codium* (Chlorophyta). A Figura 11 resume a distribuição dos espécimes de macroalgas coletados em cada uma das cidades litorâneas do estado do Rio de Janeiro em função de sua origem (**Figura 11a**) e afiliação taxonômica (**Figura 11b**). Em ambas as coletas na cidade de Armação de Búzios, um número maior de espécimes de macroalgas marinhas foi coletado, uma vez que três diferentes gêneros constituíram o alvo das expedições na costa desta cidade (**Figura 11a**). Devido ao fato de espécimes de *Ulva* e *Sargassum* terem sido coletados em duas expedições em diferentes locais de coleta em Niterói e Rio de Janeiro, ambos os gêneros acabaram somando 62% do total de macroalgas recuperadas (**Figura 11b**).

Figura 11. Número total, origem e distribuição dos espécimes de macroalgas marinhas coletadas em diferentes cidades do litoral do estado do Rio de Janeiro no presente estudo: (a) total de espécimes de hospedeiros recuperados por sítio de coleta; (b) distribuição em função da afiliação taxonômica da macroalga marinha coletada.



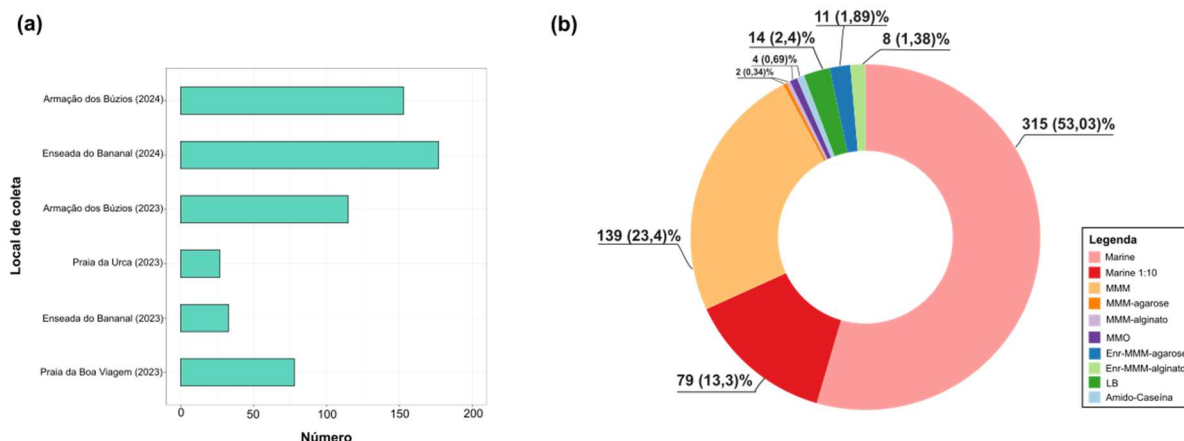
5.2 ISOLAMENTO BACTERIANO DAS MACROALGAS MARINHAS

A partir das macroalgas coletadas foram isoladas e estocadas um total de 583 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) bacterianas nos diferentes meios de cultura adotados. A distribuição das UFCs bacterianas isoladas em função do local de coleta e meio de isolamento de origem estão resumidas na **Figura 12**. Evidentemente, o isolamento dos espécimes de *Sargassum* coletados em Enseada de Bananal em janeiro de 2024 foi o que se destacou quanto a maior quantidade de UFCs recuperadas ($n = 177$; 50,32%) frente às demais expedições de coleta. Curiosamente, uma taxa bem menor de bactérias foram isoladas desse gênero de macroalga no mesmo local exatamente um ano antes ($n = 33$; 5,66%). Em seguida, as coletas realizadas em julho de 2023 ($n = 115$; 19,72%) e agosto de 2024 ($n = 153$; 26,24%) em Armação dos Búzios a partir dos espécimes de *Laurencia*, *Codium* e *Ulva* permitiram isolar um maior número de bactérias. Por sua vez, um menor número de UFCs foi isolado das amostras de *Ulva* coletadas na Praia da Urca em junho de 2023 ($n = 27$, 4,63%).

Dentre os meios utilizados, o ágar Marine foi o que se teve o maior número de bactérias isoladas ($n = 315$, 53,03%), podendo ser explicado pela sua composição nutricional, a qual favorece o crescimento de bactérias quimiorganotróficas as quais rapidamente consomem as fontes de carbono presentes nesse meio. Em contrapartida, o meio MMM ($n = 139$, 23,4%) apresentou maior quantidade de isolados em relação ao Marine diluído ($n = 79$, 13,3%), ambos meios com baixíssima concentração de nutrientes e ideais para o isolamento de bactérias marinhas oligotróficas. Importante frisar que a maioria das bactérias foram isoladas das macroalgas coletadas nesses três meios de cultura (89,73%) supracitados uma vez que ambos foram adotados em todas as expedições de coleta para o isolamento bacteriano. Os demais meios de isolamento foram empregados ocasionalmente em uma ou outra expedição de coleta na tentativa de expandir as opções disponíveis para recuperação de outros grupos taxonômicos (ex., actinobactérias com o ágar AC) ou fisiológicos (ex., consumidores de polissacarídeos marinhos com MMM suplementado com agarose ou alginato de sódio associados com as estratégias de enriquecimento) potencialmente associados às macroalgas marinhas.

Figura 12. Distribuição do número total de bactérias isoladas a partir das macroalgas marinhas coletadas nas diferentes cidades do litoral do estado do Rio de Janeiro em função: **(a)** local de coleta e **(b)** meio de isolamento de origem. A legenda situada à direita explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de barras. Siglas empregadas na legenda: Enr-MMM-agarose/alginato: MMM suplementado de agarose (1,0%) ou alginato de sódio (5,0%) empregado na estratégia de

enriquecimento; LB: Luria-Bertani; MMM: meio mínimo marinho.



5.3 TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE AGARASES PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS DAS MACROALGAS MARINHAS

Uma soma de 286 amostras bacterianas do conjunto de 583 isoladas das macroalgas marinhas (49,05%) potencialmente apresentaram atividade agarolítica após triagem realizada em meio de Hu (**Figura 14**). A maior parte dessas amostras bacterianas agarolíticas ($n = 136$; 47,55%) foram isoladas de espécimes de *Sargassum* coletados na Enseada do Bananal na expedição de janeiro de 2024, enquanto o menor número foi obtido de espécimes do mesmo gênero de feofíceas coletados no ano anterior no mesmo local ($n = 4$; 1,39%). Todavia, proporcionalmente considerando o total de bactérias isoladas recuperados naquela expedição de coleta, o menor número de bactérias com a referida atividade enzimática foi observado para o conjunto recuperado de *Ulva* coletada na Praia da Boa Viagem em junho de 2023 ($n = 7/78$; 0,9%) (**Figura 13**).

Figura 13. Resultados do ensaio de triagem da atividade agarolítica em meio de Hu das bactérias isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense. A degradação do ágar pode ser observada pela formação de halos claros em torno da massa puntiforme de crescimento bacteriano em contraste com o fundo de coloração marrom-escuro, área com o polissacarídeo-alvo ainda complexado com o iodo do lugol adicionado após 72 horas de cultivo para revelação do ensaio.

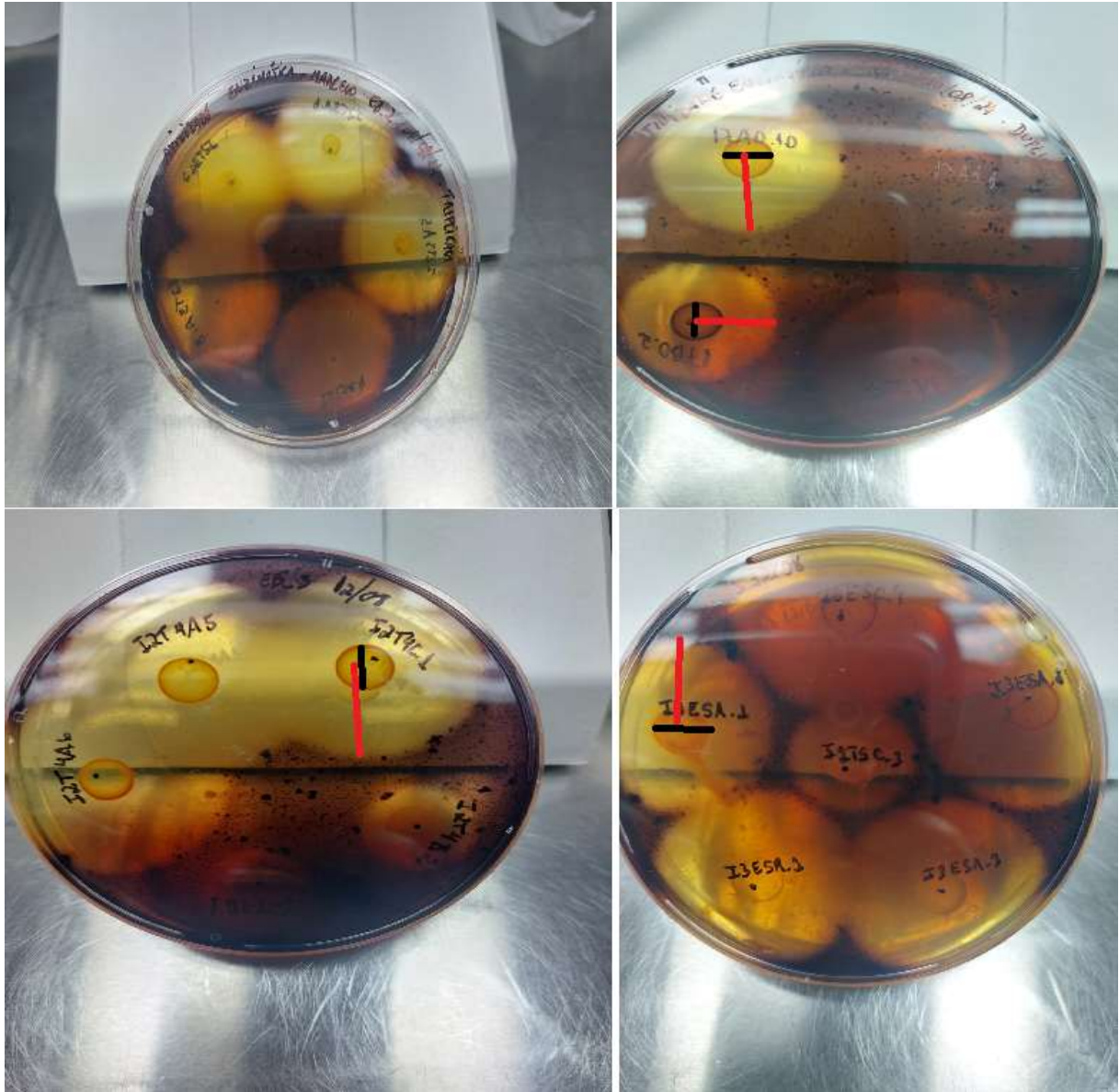
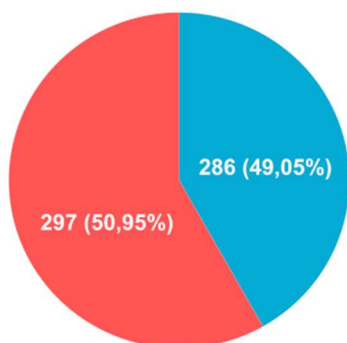
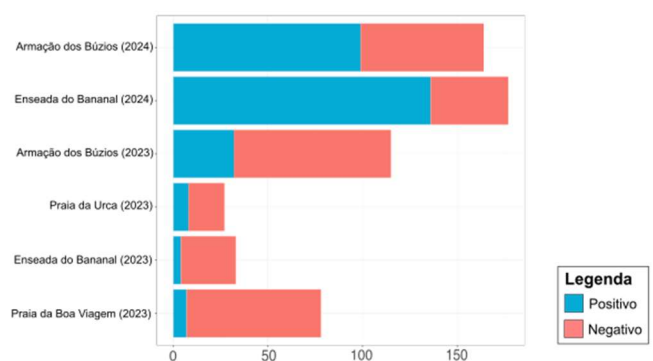


Figura 14. Distribuição do total de bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense após triagem em meio de Hu, com resultado geral frente: (a) ao total de UFCs isoladas e submetidas ao rastreamento; (b) em função do local de coleta. A legenda situada à direita explicita o padrão de cores adotado para interpretação dos gráficos de pizzas e barras.

(a)

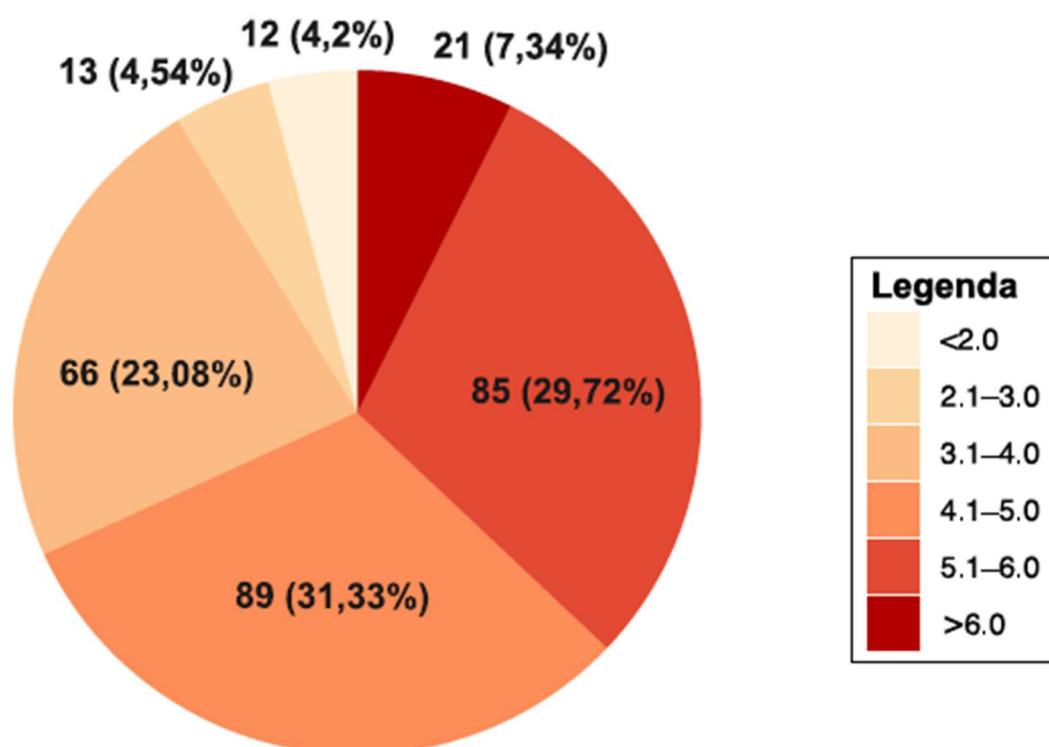


(b)



O rastreio da produção de agarases no meio de triagem adotado se revelou útil com a clara observação dos halos de degradação do polissacarídeo-substrato e, dessa forma, possibilidade de cálculo do IE para seleção de potenciais produtores dessas CAZymes para as próximas etapas do estudo (**Figura 13**). Nessa primeira etapa de triagem da atividade agarolítica, foi possível observar que aproximadamente a maioria das bactérias isoladas não foram capazes de geração dessas enzimas, pois exibiu um $IE \leq 2,0$ ($n = 12$; 4,2%), já que valor mínimo correspondente necessário para se considerar um potencial produtor enzimático é $\geq 2,0$ (Hankin; Anagnostakis, 1975). O valor de IE obtido para a maioria das amostras bacterianas nesse meio de triagem foi igual ou superior a 4,0 ($n = 194$; 61,05%), com 21 amostras com $IE \geq 6,0$ (36,02%) (**Figura 15**).

Figura 15. Intervalos de valores de Índice Enzimático (IE) observados para as bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas após triagem em meio de Hu. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de pizza.



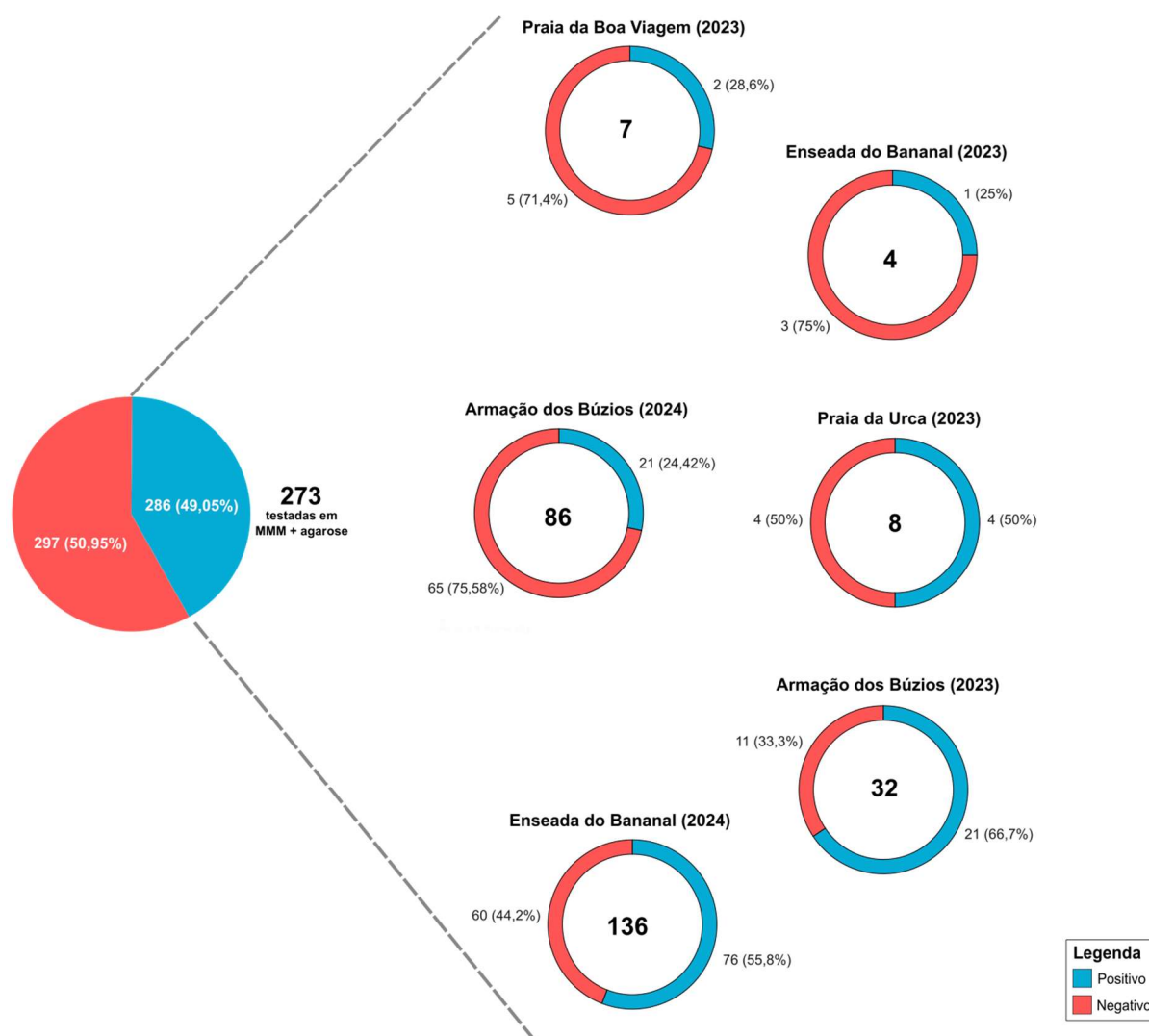
Em seguida, as amostras bacterianas agarolíticas foram selecionadas para um ensaio de perfil catabólico em meio mínimo marinho apenas com agarose como única fonte de carbono com o objetivo de restringir o total de potenciais estirpes realmente

consumidoras do polissacarídeo-alvo. Neste estágio foram avaliadas 273 bactérias isoladas das macroalgas com atividade agarolítica em meio de Hu devido a perda da viabilidade e contaminação de algumas amostras no processo de reativação a partir do estoque. Em resumo, quase metade dessas amostras bacterianas testadas ($n = 125$; 45,79%) demonstraram atividade em MMM suplementado de agarose (**Figuras 16 e 17**), revelando a eficácia do teste *in vitro* de perfil catabólico na seleção das estirpes plenamente capazes de metabolizar independentemente o polissacarídeo. Conforme esperado e novamente refletido o resultado observado na triagem da atividade enzimática em meio de Hu, a maioria das bactérias marinhas agarolíticas e com capacidade de consumo de agarose foi isolada das macroalgas coletadas na Enseada do Bananal (Niterói) e Praia Rasa (Armação dos Búzios) no ano de 2024 (**Figura 17**).

Figura 16. Resultados do ensaio de perfil catabólico em MMM acrescido de agarose (1,0%; m/v) das bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense. O consumo de agarose devido a produção de agarases pode ser verificada pela formação de halos claros em torno da massa puntiforme de crescimento bacteriano em contraste com o fundo de coloração marrom-escuro, área com o polissacarídeo-alvo ainda complexado com o iodo do lugol adicionado após 72 horas de cultivo para revelação do ensaio.



Figura 17. Distribuição do total de bactérias potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no litoral fluminense após triagem em MMM suplementado com agarose com gráficos de *donuts* representativos por sítio de coleta. A legenda situada à direita explicita o padrão de cores adotado para interpretação dos gráficos.



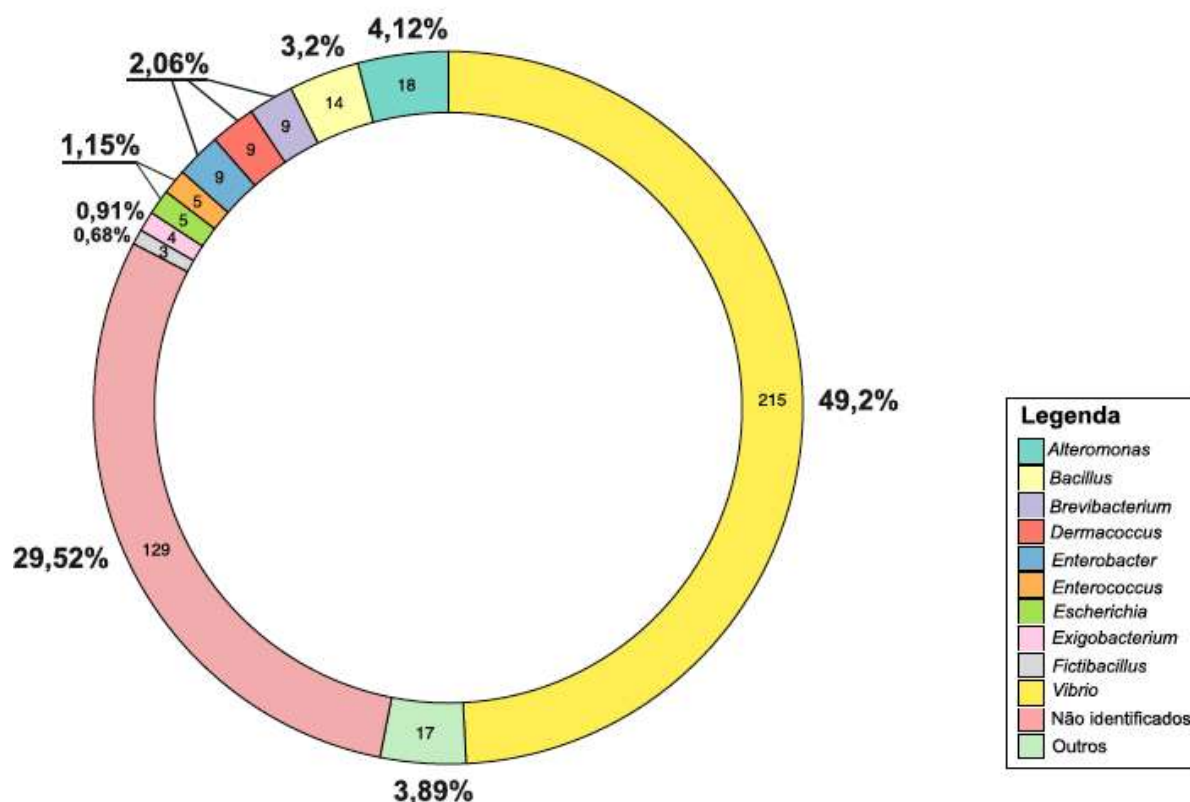
Adicionalmente, foi adotado um critério considerado fundamental na seleção fenotípica de microrganismos verdadeiramente agarolíticos, a depressão e/ou liquefação do agar e/ou agarose durante o crescimento nos meios de isolamento e nos adotados nessa etapa de triagem. Desde o isolamento bacteriano, já havia sido verificada tal capacidade para, pelo menos, 15 amostras bacterianas. Por sua vez, apenas oito permaneceram capazes de ainda causarem a depressão do ágar e/ou agarose durante o seu crescimento e apresentaram resultado positivo para a produção da CAZyme durante uma etapa ou outra da triagem da atividade agarolítica. Dentre essas estirpes potencialmente agarolíticas, as amostras Z4T3A.1 e Z6E2A.1 promoveram a depressão do polissacarídeo em MMM adicionado de agarose, enquanto a amostra Z2ESF.1 apenas exibiu tal fenótipo em meio de Hu. Em particular, todas essas amostras foram isoladas das macroalgas coletadas em Praia Rasa (Armação dos Búzios), majoritariamente de *Codium*. Tais amostras tiveram o gene do 16S rRNA amplificado por PCR e seus respectivos amplicons foram enviados e estão

sendo atualmente sequenciados para conclusão de identificação molecular frente aos bancos de dados biológicos ao nível de gênero por análises de bioinformática.

5.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS MACROALGAS MARINHAS

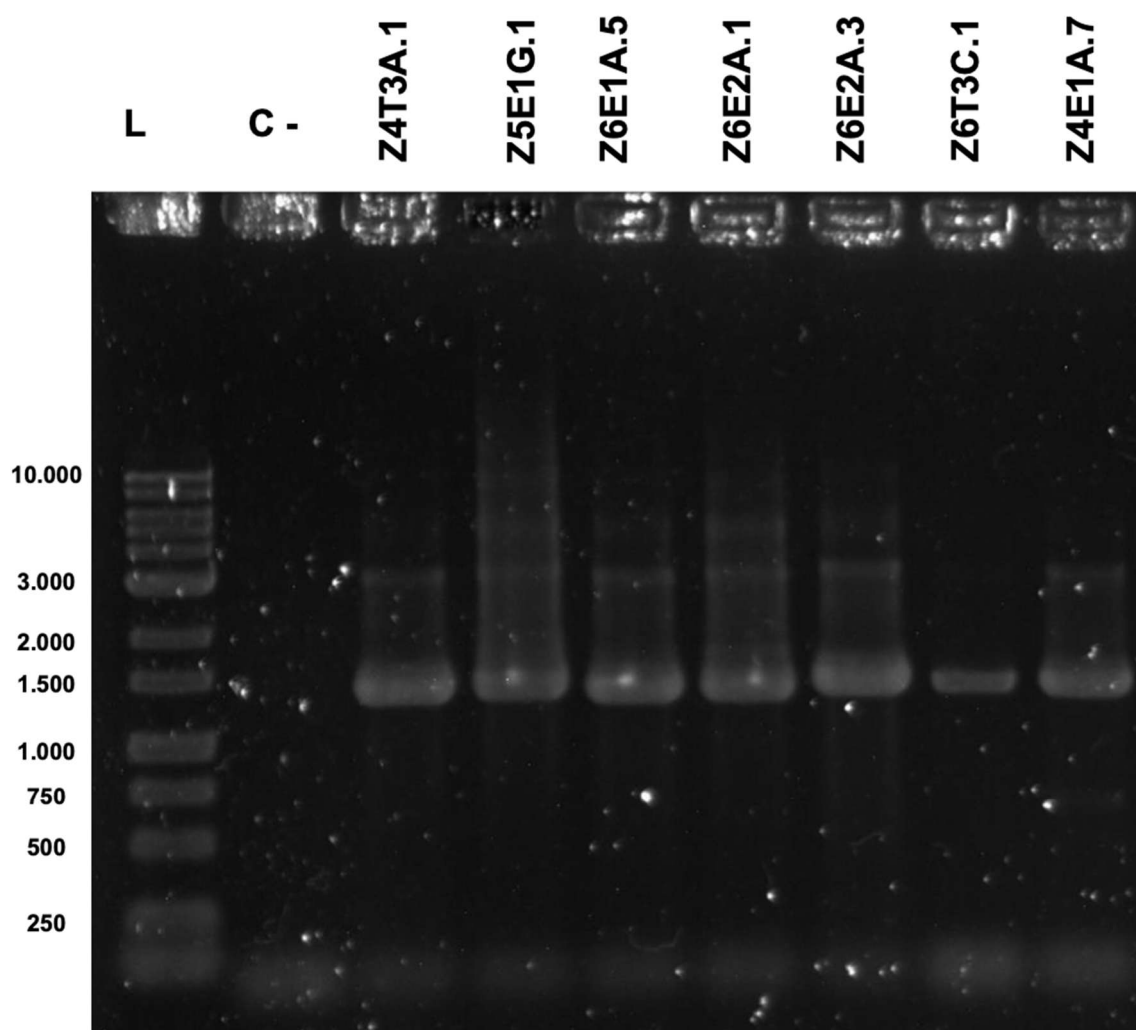
De um total de 583 bactérias isoladas das macroalgas marinhas, 437 foram enviadas para identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF, uma vez que parte das amostras isoladas das macroalgas coletadas na expedição de coleta em Armação dos Búzios no ano de 2024 ainda serão encaminhadas em futuro próximo. Desse conjunto, apenas 309 (**Figura 18**) foram identificadas com confiabilidade a nível de gênero pelo espectrômetro de massas, o que é parcialmente explicado pelo banco de dados do equipamento ser alimentado geralmente com estirpes microbianas representativas de espécies de origem humana e veterinária, com número reduzido de táxons isolados de ambientes não-clínicos, incluindo ecossistemas oceânicos. Dentre as amostras identificadas a nível de gênero com confiabilidade, o gênero mais predominante foi de *Vibrio*, com 215 estirpes (69,8%). O segundo gênero mais identificado foi *Alteromonas* com 18 estirpes (4,12%), e o terceiro gênero o *Bacillus* com 14 estirpes (3,2%). Seguindo com *Brevibacterium*, *Dermacoccus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Exiguobacterium*, *Fictibacillus*, com respectivamente, 9 (2,6%), 9 (2,6%), 9 (2,6%), 5 (1,6%), 5 (1,6%), 4 (1,3%) e 3 (1%) do total de estirpes observadas. Outros gêneros também foram encontrados com frequência menor que 1% do total, sendo eles: *Glutamicibacter*, *Kocuria*, *Metabacillus*, *Microoccus*, *Phaeobacter*, *Photobacterium*, *Priestia*, *Pseudalkalibacillus*, *Pseudomonas*, *Rosellomorea*, *Staphylococcus*, *Sutcliffeiella*, *Tenacibaculum*.

Figura 18. Identificação taxonômica a nível de gênero das estirpes bacterianas isoladas das macroalgas marinhas coletadas no presente estudo. A legenda situada à esquerda explicita o padrão de cores adotado para interpretação do gráfico de barras. Outros incluem representantes dos seguintes gêneros: *Kocuria* (2), *Metabacillus* (2), *Micrococcus* (2), *Phaeobacter* (1), *Photobacterium* (1), *Priestia* (1), *Pseudalkalibacillus* (1), *Pseudomonas* (1), *Rosellomora* (1), *Staphylococcus* (1), *Sutcliffeiella* (1) e *Tenacibaculum* (1).



Um total de sete estirpes potencialmente agarolíticas selecionadas de acordo com os critérios de capacidade de depressão do substrato polissacarídico e atividade enzimática em meio de Hu e/ou MMM acrescido de agarose (Z4T3A.1, Z5E1G.1, Z6E1A.5, Z6E2A.1, Z6E2A.3, Z6T3C.1, Z4E1A.7) tiveram seu DNA obtido e o gene do 16S rRNA amplificado com sucesso por PCR. Dessas amostras, apenas Z4T3A.1 foi identificada por espectrometria de massas com confiabilidade ao nível de gênero como pertencente ao gênero *Dermacoccus*. Conforme mencionado anteriormente, essas amostras foram recentemente submetidas ao sequenciamento automático de Sanger e serão em breve identificadas molecularmente por análises de bioinformática.

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (0,8%; m/v) dos amplicons dos genes codificadores do 16S rRNA das bactérias consideradas potencialmente agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas. Legenda: L = padrão de peso molecular de 1,0 kb; C = controle negativo.



6. DISCUSSÃO

A pesquisa científica sobre os bacteriomas cultiváveis de macroalgas marinhas no Brasil ainda é incipiente. Existem poucos estudos sobre a diversidade, estrutura e função dessas comunidades bacterianas em algas de águas brasileiras. Além disso, a maioria dos estudos existentes se concentra em aspectos taxonômicos e morfológicos, enquanto a ecologia e a fisiologia dos bacteriomas ainda são pouco compreendidas (Lotufo et al, 2022). Dentre os estudos observados, o que mais se identifica com o presente estudo é de Furbino e colaboradores (2017). Foi analisada as atividades agarolíticas e carragenolíticas de fungos extremófilos algólicos de sete diferentes espécies de macroalgas da Antártida marítima. No presente estudo possui associação com o relatado acima na metodologia empregada para isolar e identificar as bactérias agarolíticas marinhas.

Como a maioria dos resultados obtidos supracitados no texto foram nas expedições realizadas na Enseada do Bananal e em Armação dos Búzios em 2024, uma explicação plausível para o acontecimento é o enriquecimento realizado nos meios de cultura do isolamento. Além do próprio meio Marine, Marine 1:10 e MMM, foram utilizados meios de cultura como LB e suplementação em MMM de agarose, alginato e óleo com intuito de maximizar o isolamento da maior diversidade possível de bactérias ali associadas.

Carvalho e colaboradores (2020) reúne 73 artigos sobre o isolamento de bactérias associadas a macroalgas marinhas. A identificação das espécies bacterianas associadas às macroalgas foi realizada em 93% dos estudos, utilizando diversos métodos e níveis de classificação taxonômica, tendo como resultado os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidetes* e *Alphaproteobacteria* como os dominantes. Os filos bacterianos mais abundantes nos artigos publicados foram *Pseudomonadota* (29%) e *Bacillota* (23%). Com o presente estudo, confirma-se que todos os gêneros encontrados estão associados aos filos comentados acima, além da caracterização do gênero *Vibrio*, representante do filo *Pseudomonadota* como um importante representante das bactérias cultiváveis associadas às macroalgas marinhas (Egan et al., 2016). Com o presente estudo pode-se confirmar a capacidade de se isolar esse gênero com o meio Marine, correspondendo a 69,8%, com 215 das 309 estirpes enviadas para identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF, o gênero *Vibrio* foi o maior representante bacteriano.

Os gêneros *Vibrio* e *Alteromonas* foram mais recuperados utilizando o meio de cultura ágar Marine. Representantes dos gêneros supracitados habitam ambiente tipicamente marinho e estuarino, podendo ser encontrados tanto na forma planctônica, quanto associados a partículas ou outros organismos. Apresentam metabolismo fermentativo facultativo e são quimiorganotróficos, podendo utilizar polissacarídeos (como quitina e ágar), dissacarídeos (como maltose e lactose), monossacarídeos (como D-glicose e D-frutose), entre outros compostos para a obtenção de energia (Farmer et al., 2005). Esses microrganismos são majoritariamente halofílicos e mesofílicos, crescendo em temperaturas de 4 a 37°C e em ambientes com salinidade de 1 a 3% de NaCl, além de conseguirem sobreviver a pH superior a 8 (Farmer, 1992; Colwell, 2006; Farmer e Hickman-Brenner, 2006; Gomez-Gil e Roque, 2006). Dessa forma, observando os resultados listados neste trabalho, podemos concluir que a

quantidade de bactérias recuperadas serem desses gêneros está associada às suas capacidades de adaptação às variações de salinidade e temperatura da água do mar e pela sua capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos como fonte de carbono e energia.

De acordo com Overmann e colaboradores (2017), 42% dos oceanos do mundo possuem produtividade extremamente baixa de nutrientes com concentrações de nutrientes <100 nM e concentrações micromolares de carbono orgânico dissolvido utilizável. Nesse tipo de ambiente sobrevivem bactérias denominadas oligotróficas, possuindo sistemas de captação de nutrientes peculiares, além de suas taxas de crescimento serem independentes a concentração de substrato, possuírem células relativamente pequenas comparada a outras bactérias, sem motilidade e o tamanho do genoma é reduzido pela falta de gene associado a reações do seu metabolismo. No presente trabalho, para amplificar a quantidade de recuperação de bactérias com esse perfil, também foi utilizado meios de cultura com baixíssima quantidade de nutrientes, sendo elas a Marine 1:10 e MMM, que em certos casos foram suplementadas com agarose e alginato. Com os resultados obtidos, mais de 30% das estirpes foram isoladas com esses meios de cultura, evidenciando a importância de utilizar também substrato com pouca quantidade de nutrientes.

Rodrigues e colaboradores (2022) discorrem sobre identificação de UFCs presente em um determinado local e os meios de cultura utilizados. Os autores utilizaram vários meios de cultura, entretanto, cerca de 49% do resultado foi proveniente dos meios de cultura tanto com alta quantidade de nutrientes (Marine), e dos meios de cultura com baixa quantidade de nutrientes (Marine 1:10; MMM). Além disso, cita a importância de quantificar a concentração de NaCl, que nesses casos eram de 19 g/L, sendo mais de 200% comparado aos outros que tiveram pouca quantidade de salinidade. Dando alusão a esse trabalho, o resultado também é congruente, visto que as maiores concentrações de estirpes isoladas foram nesses meios de cultura.

Outro aspecto positivo em possíveis estudos dos meios de cultura para estirpes bacterianas é a inserção de extrato de macroalgas marinhas. Kleijian e colaboradores em 2017 listou esse tipo de metodologia inserindo alginato e/ou manitol ao meio de cultura. Nos seus resultados, considerou bem adaptado às necessidades metabólicas da maioria das bactérias associadas, visto que várias famílias de bactérias marinhas possuem a capacidade de degradar diferentes tipos de substratos das paredes

celulares das macroalgas marinhas. Neste trabalho também foi utilizado meio de cultura semelhante, com o MMM acrescido de alginato apenas na expedição de Armação de Búzios em 2024, podendo ter gerado o grande resultado positivo que essa expedição promoveu no quesito de bactérias com esse perfil de catabolismo do carboidrato.

Liu e colaboradores (2024) complementam com isolamento de bactérias em placas com Marine suplementadas com ágar, carragenana e fucoidana em uma câmara anaeróbia em temperatura ambiente (22°C). Após 3 semanas, foi observado crescimento, sendo repicado mais de uma vez para confirmação de pureza. Posteriormente foi inserido em outros meios de cultura semelhante ao usado neste trabalho para maximizar o isolamento de bactérias, com intuito de captar maior quantidade de bactérias agarolíticas.

Existem diferentes tipos de meios de cultura, sendo os mais comuns o meio sólido, o meio líquido e o meio semissólido. O meio sólido é preparado adicionando um agente solidificante, tendo o ágar como seu principal exemplo, permitindo assim o crescimento de microrganismos em colônias distintas, facilitando sua identificação e isolamento (Atlas, 2010). A maioria dos estudos observados na literatura cita a utilização de meios de cultura sólidos para iniciação do rastreio de atividade enzimática sob polissacarídeos (Choi et al., 2011; Barzkar, 2018). Neste trabalho, todas as 583 bactérias que foram isoladas das macroalgas pelos meios de cultura supracitados inseridas em meios de cultura sólido (meio de Hu) (Hu et al., 2008) para rastreabilidade de atividade agarolítica. A soma de 286 bactérias que positivaram ao rastreamento inserido demonstra a eficácia das estirpes bacterianas em metabolizar o ágar.

Ainda caracterizando a rastreabilidade enzimática no meio de Hu, no presente estudo foi inserido uma metodologia inédita sobre o tamanho do halo promovido pela estirpe inoculada neste meio de cultura. Dentre o padrão mínimo do IE para caracterização de atividade agarolítica sendo maior ou igual a 2 mm, a partir deste diâmetro foi determinado um ranqueamento sobre o halo, chegando aqueles que possuíam acima de 6 mm. Dentre os resultados obtidos, um maior número de estirpes tivera halo intermediário (3,1-4; 4,1-5; 5,1-6), e os extremos (entre 2,1-3 e >6) possuíam uma menor quantidade. O IE pode servir como rastreio inicial da capacidade enzimática das estirpes agarolíticas, visto que todas as bactérias passaram pelos mesmos métodos de incubação.

Outra estratégia elaborada por Thomas e colaboradores (2016) é a utilização de meio de cultura com o mínimo de nutrientes com a suplementação de agarose para rastreamento da atividade agarolítica. Esse critério foi utilizado para identificar perfil metabólico de estirpes capazes de despolimerizar a agarose, confirmando a sua produção da enzima agarase. No presente trabalho, dentre as 286 bactérias que geraram atividade enzimática no meio de Hu foram inoculadas em MMM adicionado de agarose com repique diretamente a partir do estoque bacteriano, evitando o carreamento de outros substratos advindos do processo de reativação no caldo Marine (de Oliveira et al., 2021), gerando a soma de 125 estirpes capazes de promover atividade agarolítica nesse meio, comprovando a eficácia dessa metodologia.

Além das etapas de verificação da atividade enzimática, durante todo o processo de isolamento foi observado se houve depressão e/ou liquefação do ágar e/ou agarose. Um total de 15 estirpes foram capazes de gerar depressão no ágar, entretanto, apenas 7 foram capazes de gerar depressão no ágar e promover atividade enzimática tanto no meio de Hu quanto no MMM + agarose. O alto número de resultados positivos na triagem pode se dever a existência de CAZymes multifuncionais ou poliespecíficas que podem consumir eventualmente outros substratos, como o ágar já que foram capazes de gerar liquefação do ágar (Liu et al., 2016; Sun et al., 2023).

De acordo com Fasim e colaboradores (2021), a otimização dos meios de culturas é essencial para padronização a nível industrial. Introduzindo assim os espécimes não só em meios de culturas sólidos, mas também nos líquidos, faz-se fundamental para avaliar quantitativamente a atividade enzimática, por exemplo. Além disso, as enzimas agarolíticas não necessariamente correspondem a produção com condições ideais em meio sólido, sendo impossibilitadas de replicação e escalonamento projetando seu emprego em nível industrial. Dessa forma, para complementar os estudos referentes a atividade agarolítica, é necessário a inserção de meios de cultura em estado líquido para complementação das atividades e confirmação dos resultados aqui obtidos.

Este estudo é o segundo trabalho associado à bioprospecção de microrganismos agarolíticos no Brasil, sendo o primeiro a utilizar as bactérias isoladas no próprio Brasil, mais especificamente no Rio de Janeiro. Os passos apresentados até aqui promoveram um início da caminhada em maximizar os estudos sobre bactérias agarolíticas, fomentando a área da biotecnologia marinha e impulsionando as

entidades acadêmicas e indústria brasileira na criação de modelos mais baratos e sustentáveis na produção de bioprodutos de alto valor agregado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1. CONCLUSÕES

- Um total de 583 bactérias foram isoladas da microbiota epifítica e total de 26 espécimes de macroalgas marinhos pertencentes aos gêneros *Ulva*, *Sargassum*, *Laurencia* e *Codium* coletados em seis expedições de coleta em três diferentes cidades do litoral fluminense;
- Mais de 95% das estirpes exibiram um Índice Enzimático igual ou superior a 2,0, indicativo de geração ativa das CAZymes nas condições de ensaio adotadas;
- Um conjunto de 125 bactérias isoladas das macroalgas marinhas foram capazes de crescer e manter atividade agarolítica em meio mínimo suplementado exclusivamente de agarose como fonte de carbono;
- 15 bactérias isoladas das macroalgas marinhas causaram depressão e/ou liquefação do ágar desde o isolamento bacteriano até as etapas da triagem em meios de cultura sólido. Desse total, 7 amostras mantiveram tal fenótipo agarolítico e atividade de produção da enzima em algum dos dois meios de triagem adotados;
- *Vibrio* foi o gênero dominante de bactérias isoladas das macroalgas marinhas, seguido de outros representantes da classe Gammaproteobacteria (Pseudomonadota). Contudo, uma parcela significativa das amostras não foi identificada por espectrometria de massas MALDI-TOF, requerendo a sua identificação posterior por amplificação e sequenciamento do gene codificador do 16S rRNA;
- Dentre as bactérias consideradas verdadeiramente agarolíticas no estudo, apenas uma foi identificada por espectrometria de massas, como pertencente ao gênero *Dermacoccus*. Todas as estirpes tiveram seu DNA genômico extraído e o gene codificador do 16S rRNA amplificado e foram submetidas ao sequenciamento automático de Sanger para conclusão de sua identificação por análises de bioinformática.

7.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho figura entre os primeiros no cenário nacional centrado na bioprospecção de microrganismos agarolíticos do holobionte macroalga. Com as

estirpes bacterianas potencialmente produtoras dessas enzimas e com base nos resultados aqui obtidos, listam-se abaixo os passos imediatamente posteriores em subsequentes projetos do grupo de pesquisa de curto a longo prazo:

- Finalização da identificação molecular das bactérias consideradas como verdadeiramente agarolíticas e, em extensão, do conjunto com atividade de produção da enzima em meio sólido e capacidade de consumo de agarose;
- Avaliação da curva de crescimento e da capacidade de consumo de agarose em meio mínimo mineral no estado líquido do total de 125 bactérias com produção de enzimas em meio de Hu e MMM acrescido de agarose;
- Investigação da produção da agarases com as estirpes bacterianas agarolíticas identificadas a partir de seu cultivo em condições fermentativas em meio líquido e dosagem da atividade enzimática dos extratos brutos obtidos (sobrenadantes livres de células e lisados celulares);
- Seleção das estirpes bacterianas agarolíticas com atividade enzimática determinada em meio sólido e líquido para sequenciamento, montagem, anotação do genoma completo, com foco na reconstrução de seus CAZomas e rastreio dos potenciais CGCs especializados com o catabolismo de agarose;
- Clonagem, expressão heteróloga, purificação cromatográfica e caracterização bioquímica das agarases com genes codificadores descobertos por mineração genômica das estirpes bacterianas agarolíticas isoladas das macroalgas marinhas;
- Aplicação tanto das agarases recombinantes quanto das enzimas obtidas a partir dos extratos brutos das estirpes bacterianas agarolíticas para a produção de AOs e/ou NAOs e sacarificação da biomassa de rodofíceas;

Determinação de atividades antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante e outras bioatividades farmacologicamente relevantes dos potenciais AOs e/ou NAOs gerados pelas agarases descobertas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, L., ROSA, M. R., ARACELI L., et al. Ruiz. Chapter 17 - **Enzymes in the third generation biorefinery for macroalgae biomass**. Biomass, Biofuels, Biochemicals, Elsevier, 2020, Pages 363-396, ISBN 9780128198209. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00017-X>. Acesso em: 29 jan.2025.

ADAIR, K.L., DOUGLAS, A.E. **Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition.** Curr Opin Microbiol. 2017 Feb; 35:23-29. Disponível em: doi: 10.1016/j.mib.2016.11.002. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27907842. Acesso em: 13 jan.2025.

analyses provide insights into marine polysaccharide-degrading enzymes in the sponge-derived Pseudoalteromonas sp. PA2MD11. Int J Biol Macromol. 2021 Nov 30; 191:973-995. Disponível em: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.076. Epub 2021 Sep 21. PMID: 34555402. Acesso 12 jan.2025.

ARNOSTI, C., WIETZ, M., BRINKHOFF, T., HEHEMANN, J.H., PROBANDT, D., ZEUGNER, L., AMANN, R. **The Biogeochemistry of Marine Polysaccharides: Sources, Inventories, and Bacterial Drivers of the Carbohydrate Cycle.** Ann Rev Mar Sci. 2021 Jan; 13:81-108. Disponível em: doi: 10.1146/annurev-marine-032020-012810. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32726567. Acesso em: 05 jan.2025.

BÄUMGEN, M., DUTSCHEI, T., BORNSCHEUER, U.T. **Marine Polysaccharides: Occurrence, Enzymatic Degradation and Utilization.** Chembiochem. 2021 Jul 1;22(13):2247-2256. Disponível em: doi: 10.1002/cbic.202100078. Epub 2021 May 14. PMID: 33890358; PMCID: PMC8360166. Acesso em: 05 jan.2025.

BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T. et al. **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.** Microbiome. 2020 Jun 30;8(1):103. Disponível em: doi: 10.1186/s40168-020-00875-0. Erratum in: Microbiome. 2020 Aug 20;8(1):119. Disponível em: doi: 10.1186/s40168-020-00905-x. PMID: 32605663; PMCID: PMC7329523. Acesso em: 14 jan.2025.

BERTASA, M. BOTTEON, A. BRAMBILLA, L. RIEDO, C. CHIANTORE, O. POLI, T. SANSONETTI, A. SCALARONE, D. (2017). **Cleaning materials: A compositional multi-analytical characterization of commercial agar powders.** Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 125. Disponível em: doi: 10.1016/j.jaap.2017.03.011. Acesso em: 09 jan.2025.

BONITO, G. **Ecology and evolution of algal-fungal symbioses**. Curr Opin Microbiol. 2024 Jun; 79:102452. Disponível em: doi: 10.1016/j.mib.2024.102452. Epub 2024 Mar 10. PMID: 38461593. Acesso em: 18 jan.2025.

BOUKID, F., CASTELLARI, M. (2021). **Alimentos e bebidas contendo algas e ingredientes derivados lançados no mercado de 2015 a 2019: uma perspectiva de rotulagem frontal com foco especial na Espanha**. Alimentos, 10 (1), 173. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/1/173>. Acesso em: 18 dez. 2024.

BOYADJIAN, Célia. **Estudos de conteúdo de cálculo dentário e os primeiros passos da Microarqueobotânica brasileira**. Os trabalhos aqui reunidos foram originalmente apresentados no I Simpósio Brasileiro de Arqueobotânica, p. 109., 2024. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Tais-Capucho/publication/386419944_20_anos_de_Arqueobotanica_no_Brasil_uma_disciplina_em_ascensao/links/67507c15a7fbc259f1ac99ec/20-anos-de-Arqueobotanica-no-Brasil-uma-disciplina-em-ascensao.pdf#page=110. Acesso 15 dez. 2024.

BRAUNE, W., & GUIRY, MD (2011). **Algas marinhas: Um guia de cores para algas verdes, marrons e vermelhas bentônicas comuns dos oceanos do mundo**. Alemanha: ARG Gantner Verlag KG; ISBN 978-3-906166-90-2. Disponível em: <http://tvhhdh.vnio.org.vn:8080/xmlui/handle/123456789/13946>. Acesso em: 12 dez. 2024.

BUSETTI, A., MAGGS, C.A., GILMORE, B.F. (2017). **Marine macroalgae and their associated microbiomes as a source of antimicrobial chemical diversity**. *European Journal of Phycology*, 52(4), 452–465. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1376709>. Acesso em: 22 jan.2025.

CANTAREL, B.L., COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics**. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D233-8. Disponível em: doi: 10.1093/nar/gkn663. Epub 2008 Oct 5. PMID: 18838391; PMCID: PMC2686590. Acesso em: 01 jan.2025.

CARDOSO, Isabel L. A. **Extração e análise de compostos com potencial antibacteriano e antifúngico da alga vermelha *Grateloupia turuturu***. 2018. Dissertação de Mestrado. Disponível em: https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/86132/1/TESE_Isabel%20Cardoso.pdf. Acesso em: 12 dez. 2024.

CARNEIRO, I.M.; PAIVA, P.C.; BERTOCCI, I. *et al.* **Reconciliando a variabilidade vertical e horizontal em populações de *Sargassum* para melhor monitoramento ambiental**. J Appl Phycol 32, 717–728 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01882-x>. Acesso em: 03 dez.2024.

CARNEIRO, V. A. R., CASSANO, V. (2021). **Estudos moleculares e morfológicos do gênero *Ulva* L. (Ulvaes, Chlorophyta) no sudeste do Brasil**. Disponível em: https://web.archive.org/web/20210921174712id_/https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-14082021-150524/publico/Victor_Carneiro_CORRIG.pdf. Acesso em: 03 dez. 2024.

CASCAREJO, Margarida M. D. F. (2018). **Uso de algas em dermocosmética (Master's thesis, Universidade de Coimbra (Portugal))**. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/3e928b971fb7cc264919f6e7e78949fc/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>. Acesso em 18 dez. 2024.

CAVALCANTI, Maria Irisvalda L.G., **Macroalgas arribadas da costa brasileira: biodiversidade e potencial de aproveitamento**. 183p. il, Tese (Doutorado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente) - Universidade de São Paulo - São Paulo, 2021. Disponível em: https://smastr16.blob.core.windows.net/pgibt/sites/242/2022/09/maria_irisvalda_l._g._cavalcanti_dr.pdf. Acesso em: 17 out.2024.

CAZypedia Consortium. **Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes**. Glycobiology. 2018 Dec 1;28(1):3-8. Disponível em: doi: 10.1093/glycob/cwx089. PMID: 29040563. Acesso em: 02 jan.2025.

CELANT, A., MAGRI, D., & STASOLLA, F. R. (2015). **Coleção de restos vegetais de contextos arqueológicos**. Microtécnicas e protocolos de plantas, 469-485. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-19944-3_25. Acesso em: 15 dez. 2024.

CHAI, G., LI, J., LI, Z. **The interactive effects of ocean acidification and warming on bioeroding sponge *Spheciospongia vesparium* microbiome indicated by metatranscriptomics**. Microbiol Res. 2024 Jan; 278:127542. Disponível em: doi: 10.1016/j.micres.2023.127542. Epub 2023 Nov 7. PMID: 37979302. Acesso em: 16 jan.2025.

CHAPMAN, R.L. **Algae: the world's most important "plants" —an introduction**. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18, 5–12 (2013). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9>. Acesso 01 dez.2024.

CHEN, X., FU, X., HUANG, L., XU, J., GAO, X. **Agar oligosaccharides: A review of preparation, structures, bioactivities and application**. Carbohydr Polym. 2021 Aug 1; 265:118076. Disponível em: doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118076. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33966840. Acesso em: 30 jan.2025.

CHETTRI, D., VERMA, A.K., VERMA, A.K. **Innovations in CAZyme gene diversity and its modification for biorefinery applications**. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020 Sep 1;28:e00525. Disponível em: doi: 10.1016/j.btre. 2020.e00525. PMID: 32963975; PMCID: PMC7490808. Acesso em: 27 jan.2025.

CHI, W.J., CHANG, Y.K., HONG, S.K. **Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 May;94(4):917-30. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-012-4023-2. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22526785. Acesso em: 12 jan.2025.

CIANCIA, M., MATULEWICZ, M.C., TUVIKENE, R. **Structural Diversity in Galactans From Red Seaweeds and Its Influence on Rheological Properties**. *Front Plant Sci*. 2020 Sep 10; 11:559986. Disponível em: doi: 10.3389/fpls.2020.559986. PMID: 33013979; PMCID: PMC7511586. Acesso em: 06 jan.2025.

COCENTINO, Adilma de L. M.; FUJII, Mutue T.; REIS, Thiago N. V.; GUIMARÃES-BARROS, Nathalia C.; ROCHA, Marcia F.; NEUMANN-LEITÃO, Sigrid. **Diversity and distribution Patterns of the infralittoral green macroalgae from potiguar basin, Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil**, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abb/a/n77x5MHHFDNzHTfx8MsBPZn/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 03 dez.2024.

COELHO, C., SILVA, R., VELOSO-GOMES, F., & TAVEIRA-PINTO, F. (2009). **Potential effects of climate change on northwest Portuguese coastal zones.** *ICES Journal of Marine Science*, 66(7), 1497-1507. Disponível em: <https://academic.oup.com/icesjms/article/66/7/1497/658590?login=false>. Acesso em: 10 dez. 2024.

COSTA, C. S. G., PIMENTEL, F. B., PINTO, E., COSTA, A. S. G., ALVES, R. C., ALMEIDA, A., ... & OLIVEIRA, M. B. P. P. (2016). **Macroalgas edíveis uma fonte de minerais essenciais (Edible macroalgae as a source of essencial elements).** Livro de Atas do XIII Encontro de Química dos Alimentos. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/111316/2/258719.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2024.

COTAS, J.; GOMES, L.; PACHECO, D.; & PEREIRA, L. (2023). **Serviços ecossistêmicos fornecidos por algas marinhas.** *Hidrobiologia*, 2 (1), 75-96. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-9917/2/1/6>. Acesso em: 08 dez. 2024.

DAN, M., SHEN, J., ZHAO, G., WANG, D. **Complete conversion of agarose into water soluble agaro-oligosaccharides by microwave assisted hydrothermal hydrolysis.** *Food Chem.* 2022 Nov 30; 395:133622. Disponível em: doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133622. Epub 2022 Jul 2. PMID: 35802971. Acesso em: 10 jan.2025.

DAS, A., RINGU, T., GHOSH, S., PRAMANIK, N. **A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers.** *Polym Bull (Berl)*. 2023;80(7):7247-7312. Disponível

em: doi: 10.1007/s00289-022-04443-4. Epub 2022 Aug 25. PMID: 36043186; PMCID: PMC9409625. Acesso em: 08 jan. 2025.

DE OLIVEIRA, L.S., GREGORACCI, G.B., SILVA, G.G., SALGADO, L.T., FILHO, G.A., ALVES-FERREIRA, M., PEREIRA, R.C., THOMPSON, F.L. **Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome**. BMC Genomics. 2012 Sep 17; 13:487. Disponível em: doi: 10.1186/1471-2164-13-487. PMID: 22985125; PMCID: PMC3534612. Acesso em 17 jan.2025.

DE OLIVEIRA, B.F.R., LOPES, I.R., CANELLAS, A.L.B, MURICY, G., JACKSON, S.A., DOBSON, A.D.W., LAPORT, M.S. **Genomic and in silico protein structural FRAGOSO, Helena R. Monitoramento de uma comunidade subtropical de macroalgas: variação sazonal e relação com fatores abióticos**. Disponível em: https://ccnh.ufabc.edu.br/arquivos/CENTRAL/4.Ensino/1.Graduacao/TCCs/2018_TC_C_HelenaFragoso.pdf. Acesso em: 05 dez. 2024

DITTAMI, S.M., ARBOLEDA, E., AUGUET, J. et al. 2021. **Uma perspectiva comunitária sobre o conceito de holobiontes marinhos: situação atual, desafios e direções futuras**. *PeerJ* 9: e10911. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.10911>. Acesso em: 15 jan.2025.

DUMAY, J.; MORANÇAS, M. Proteínas e pigmentos. In: **Algas marinhas na saúde e prevenção de doenças**. Academic Press, 2016. p. 275-318. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128027721000099>. Acesso em: 05 dez. 2024.

EGAN, S., KUMAR, V., NAPPI, J., GARDINER, M. (2017). **Diversidade microbiana e interações simbióticas com macroalgas**. Em *Algal and cyanobacteria symbioses* (pp. 493–546). Disponível em: https://doi.org/10.1142/9781786340580_0016. Acesso em 17 jan.2025.

EGER, A.M.; MARZINELLI, E.M.; BEAS-LUNA, R. et al. **O valor dos serviços ecossistêmicos em florestas globais de algas marinhas**. *Nat Commun* 14, 1894

(2023). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37385-0>. Acesso em: 08 dez.2024.

FIGUEIRA, T. A., & MARTINS, N. T. (2020). **Macroalgas e suas aplicações biotecnológicas**. *BOTÂNICA NO INVERNO 2018 Organizadores Laboratório de Algas Marinhas*, 51. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Tiphane-Andrade-](https://www.researchgate.net/profile/Tiphane-Andrade-Figueira/publication/341553875_Macroalgas_e_suas_aplicacoes_biotecnologicas/links/5ec6f7d5299bf1c09ad258e3/Macroalgas-e-suas-aplicacoes-biotecnologicas.pdf)

[Figueira/publication/341553875_Macroalgas_e_suas_aplicacoes_biotecnologicas/links/5ec6f7d5299bf1c09ad258e3/Macroalgas-e-suas-aplicacoes-biotecnologicas.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tiphane-Andrade-Figueira/publication/341553875_Macroalgas_e_suas_aplicacoes_biotecnologicas/links/5ec6f7d5299bf1c09ad258e3/Macroalgas-e-suas-aplicacoes-biotecnologicas.pdf). Acesso em: 14 dez. 2024.

FISCHBACH, M.A., SEGRE, J.A. **Signaling in Host-Associated Microbial Communities**. *Cell*. 2016 Mar 10;164(6):1288-1300. Disponível em: doi: 10.1016/j.cell.2016.02.037. PMID: 26967294; PMCID: PMC4801507. Acesso em: 13 jan.2025.

FU, X.T., KIM, S.M. **Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications**. *Mar Drugs*. 2010 Jan 26;8(1):200-18. Disponível em: doi: 10.3390/md8010200. PMID: 20161978; PMCID: PMC2817930. Acesso em: 12 jan.2025.

FUKUDA, J. C. (2006). **Avaliação de Variáveis para Delimitação de Áreas Protegidas Costeiras e Marinhas: sugestão de limites para uma Unidade de Conservação costeira de Uso Sustentável na região das Reentrâncias Maranhenses** (Estado do Maranhão, Brasil). Disponível em: <http://www.tedebr.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/1197>. Acesso 10 dez. 2024.

GALINDO, F. S., TEIXEIRA FILHO, M. C. M., BUZETTI, S., ALVES, C. J., DE PAULA GARCIA, C. M., & NOGUEIRA, L. M. (2019, April). **Extrato de algas como bioestimulante da produtividade do trigo irrigado na região do Cerrado**. In *Colloquium Agrariae*. ISSN: 1809-8215 (Vol. 15, No. 1, pp. 130-140). Disponível em: <https://journal.unoeste.br/index.php/ca/article/view/2346>. Acesso em: 21 dez. 2024.

GILES, K., PLUVINAGE, B., BORASTON, A.B. **Structure of a glycoside hydrolase family 50 enzyme from a subfamily that is enriched in human gut microbiome bacteroidetes.** *Proteins*. 2017 Jan;85(1):182-187. Disponível em: doi: 10.1002/prot.25189. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27756110. Acesso em: 25 jan.2025.

GLYN, R. H., GUILLAUME, D., GIDEON, J. D., HARRY B. **Aprendendo com estratégias microbianas para degradação de polissacarídeos.** *Biochem Soc Trans* 15 de fevereiro de 2016; 44 (1): 94–108. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1042/BST20150180>. Acesso em: 02 jan.2025.

GODA, D.A., SHALABY, N.H., SOLIMAN, N.A. **Improvement of *Bacillus subtilis* PI agarase production, hydrolysate scavenging capability assessment, and saccharification of algal biomass for green ethanol generation.** *Sci Rep* 14, 16417 (2024). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65736-4>. Acesso em: 29 jan.2025.

GONZÁLEZ-PECH, R.A., LI, V.Y., GARCIA, V., BOVILLE, E., MAMMONE, M., KITANO, H., RITCHIE, K.B., MEDINA, M. **The Evolution, Assembly, and Dynamics of Marine Holobionts.** *Ann Rev Mar Sci*. 2024 Jan 17; 16:443-466. Disponível em: doi: 10.1146/annurev-marine-022123-104345. Epub 2023 Aug 8. PMID: 37552896. Acesso em: 15 jan.2025.

GRONDIN, J.M., TAMURA, K., DÉJEAN, G., ABBOTT, D.W., BRUMER, H. **Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities.** *J Bacteriol*. 2017 Jul 11;199(15):e00860-16. Disponível em: doi: 10.1128/JB.00860-16. PMID: 28138099; PMCID: PMC5512228. Acesso em: 03 jan.2025.

HEHEMANN, J.H., BORASTON, A.B., CZJZEK, M. **A sweet new wave: structures and mechanisms of enzymes that digest polysaccharides from marine algae.** *Curr Opin Struct Biol*. 2014 Oct; 28:77-86. Disponível em: doi: 10.1016/j.sbi.2014.07.009. Epub 2014 Aug 17. PMID: 25136767. Acesso em: 05 jan. 2025.

HETTLE, A.G., VICKERS, C.J., BORASTON, A.B. **Sulfatases: Critical Enzymes for Algal Polysaccharide Processing**. *Front Plant Sci*. 2022 Apr 28; 13:837636. Disponível em: doi: 10.3389/fpls.2022.837636. PMID: 35574087; PMCID: PMC9096561. Acesso em: 05 jan.2025.

HOLDT, S.L., KRAAN, S., (2011). **Compostos bioativos em algas marinhas: aplicações e legislação de alimentos funcionais**. *Journal of applied phycology*, 23, 543-597. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-010-9632-5>. Acesso em 19 dez. 2024.

HOLLANTS, J., LELIAERT, F., DE CLERCK, O., WILLEMS, A. (2013). **What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations**. *FEMS microbiology ecology*, Volume 83, Edição 1, janeiro de 2013, Páginas 1–16. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01446.x>. Acesso em 17 jan.2025.

IGARASHI, Marco Antonio. **Panorama da aquicultura no Japão e perspectivas de desenvolvimento da atividade no Brasil**. *Holos*, v., 2021. Disponível em: https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A15%3A22464431/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A151243625&crl=c&link_origin=scholar.google.com.br. Acesso em: 15 dez. 2024.

IHUA, M.W., FITZ GERALD, J.A., GUIHÉNEUF, F. et al. **Diversity of bacteria populations associated with different thallus regions of the brown alga *Laminaria digitata***. *PLoS One*. 2020 Nov 25;15(11):e0242675. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0242675. PMID: 33237941; PMCID: PMC7688147. Acesso em: 20 jan.2025.

JAHROMI, S.T., BARZKAR, N. **Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Aug;102(16):6847-6863. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-018-9156-5. Epub 2018 Jun 16. PMID: 29909571. Acesso em: 13 jan.2025.

JIANG, C., CHENG, D., LIU, Z., SUN, J., MAO, X. **Advances in agaro-oligosaccharides preparation and bioactivities for revealing the structure-**

function relationship. Food Research International. Volume 145. 2021. 110408. ISSN 0963-9969. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110408>. Acesso em: 30 jan.2025.

JIANG, C., LIU, Z., CHENG, D., MAO, X. **Agarose degradation for utilization: Enzymes, pathways, metabolic engineering methods and products.** Biotechnol Adv. 2020 Dec; 45:107641. Disponível em: doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107641. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33035614. Acesso em: 25 jan.2025.

JIANG, C., LIU, Z., LIU, J. *et al.* **Applying Both Chemical Liquefaction and Enzymatic Catalysis Can Increase Production of Agaro-Oligosaccharides from Agarose.** *J. Ocean Univ. China* 19, 1371–1377 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4439-8>. Acesso em: 10 jan.2025.

JIANG, F., XU, X.W., CHEN, F.Q., WENG, H.F., CHEN, J., RU, Y., XIAO, Q., XIAO, A.F. **Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review.** *Mar Drugs*. 2023 May 14;21(5):299. Disponível em: doi: 10.3390/md21050299. PMID: 37233493; PMCID: PMC10220669. Acesso em: 07 jan.2025.

JONES, D.R., THOMAS, D., ALGER, N, *et al.* **SACCHARIS: an automated pipeline to streamline discovery of carbohydrate active enzyme activities within polyspecific families and de novo sequence datasets.** *Biotechnol Biofuels* 11, 27 (2018). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1027-x>. Acesso em: 04 jan.2025.

KANDASAMY, K.P., SUBRAMANIAN, R.K., SRINIVASAN, R., RAGUNATH, S., BALAJI, G., GRACY, M., LATHA K. **Shewanella algae and Microbulbifer elongatus from marine macro-algae - isolation and characterization of agar-hydrolysing bacteria.** *Access Microbiol.* 2020 Sep 10;2(11):acmi000170. Disponível em: doi: 10.1099/acmi.0.000170. PMID: 33294773; PMCID: PMC7717482. Acesso 01: jan.2025.

KIM, D.H., LIU, J.J., LEE, J.W., et al. **Biological upgrading of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose to a new platform chemical**. *Green Chem.* 2020 Mar 7;22(5):1776-1785. Disponível em: doi: 10.1039/c9gc04265b. Epub 2020 Feb 24. PMID: 33790689; PMCID: PMC8009285. Acesso em 29 jan.2025.

KIM, D.H., YUN, E.J., LEE, S.H., KIM, K.H. **Novel Two-Step Process Utilizing a Single Enzyme for the Production of High-Titer 3,6-Anhydro-l-galactose from Agarose Derived from Red Macroalgae**. *J Agric Food Chem.* 2018 Nov 21;66(46):12249-12256. Disponível em: doi: 10.1021/acs.jafc.8b04144. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30354118. Acesso em: 10 jan.2025.

KIM, H.T., YUN, E.J., WANG, D., CHUNG, J.H., CHOI, I.G., KIM, K.H. **High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass**. *Bioresour Technol.* 2013 May; 136:582-7. Disponível em: doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.038. Epub 2013 Mar 16. PMID: 23567734. Acesso em: 29 jan.2025.

KIM, J. YUN, E. SEO, N. YU, S. KIM, D. CHO, K. AN, H. KIM, J. CHOI, I. KIM, K. (2017). **Enzymatic liquefaction of agarose above the sol-gel transition temperature using a thermostable endo-type β -agarase, Aga16B**. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Disponível em: doi:10.1007/s00253-016-7831-y. Acesso: 10 jan.2025.

KOROPATKIN, N., CAMERON, E. & MARTENS, E. **Como o metabolismo do glicano molda a microbiota intestinal humana**. *Nat Rev Microbiol* 10, 323–335 (2012). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>. Acesso em 01: jan.2025.

KUMAR, P., VERMA, A., SUNDHARAM, S.S., OJHA, A.K., KRISHNAMURTHI, S. **Exploring Diversity and Polymer Degrading Potential of Epiphytic Bacteria Isolated from Marine Macroalgae**. *Microorganisms.* 2022 Dec 19;10(12):2513. Disponível em: doi: 10.3390/microorganisms10122513. PMID: 36557766; PMCID: PMC9786321. Acesso em: 23 jan.2025.

LAHAYE, M., ROCHAS, C. (1991). **Chemical structure and physico-chemical properties of agar. Hydrobiologia.** 221. 137-148. Disponível em: doi:10.1007/bf00028370. Acesso em: 08 jan.2025.

LEE, C.H., LEE, C.R., HONG, S.K. **Biochemical characterization of a novel cold-adapted agarotetraose-producing α -agarase, AgaWS5, from Catenovulum sediminis WS1-A.** Appl Microbiol Biotechnol. 2019 Oct;103(20):8403-8411. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-019-10056-1. Epub 2019 Aug 3. PMID: 31375882. Acesso em: 26 jan.2025.

LEMAY, M.A., DAVIS, K.M., MARTONE, P.T., PARFREY, L.W. **Kelp-associated Microbiota are Structured by Host Anatomy**¹. J Phycol. 2021 Aug;57(4):1119-1130. Disponível em: doi: 10.1111/jpy.13169. Epub 2021 May 13. PMID: 33749821. Acesso em: 21 jan.2025.

LIAN, J. ZOU, D., TREBUCH, L., DUAN, C., LI, M. (2024). **Exploring the interactions between algae and archaea.** Marine Life Science & Technology. 1-16. Disponível em: 10.1007/s42995-024-00217-1. Acesso em: 18 jan.2025.

LLERA GONZÁLEZ, E. M.; ÁLVAREZ RABOSO, J. **Algas marinas de Asturias. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras. Oviedo**, 2007. Disponível em: <https://www.ibader.gal/ficha/815/1611/Algas-marinas-de-Asturias-2007-.html>. Acesso 10 dez. 2024.

LOMARTIRE, S., GONÇALVES, A.M.M. **Algal Phycocolloids: Bioactivities and Pharmaceutical Applications.** Mar Drugs. 2023 Jun 28;21(7):384. Disponível em: doi: 10.3390/md21070384. PMID: 37504914; PMCID: PMC10381318. Acesso em: 07 jan. 2025.

LOMBARD, V., GOLACONDA, R. H., DRULA, E., COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B. **The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013.** Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D490-5. Disponível em: doi: 10.1093/nar/gkt1178. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24270786; PMCID: PMC3965031. H. Acesso em: 04 jan.2025.

MARCHESI, J.R., RAVEL, J. **The vocabulary of microbiome research: a proposal.** Microbiome. 2015 Jul 30; 3:31. Disponível em: doi: 10.1186/s40168-015-0094-5. PMID: 26229597; PMCID: PMC4520061. Acesso em: 14 jan.2025.

MARINHO-SORIANO, E.; NUNES, S.O.; CARNEIRO, M.A.A.; PEREIRA, D.C. **Remoção de nutrientes de águas residuais de aquicultura utilizando a macroalga *Gracilaria birdiae*.** Biomass and Bioenergy, v. 33, n. 2, p. 327-331, 2009. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953408001700>. Acesso em: 06 dez. 2024.

MARKUSSEN BJORBAEKMO, M.F., BRODIE, J., KRABBERØD, A.K. et al. **18S rDNA gene metabarcoding of microeukaryotes and epi-endophytes in the holobiome of seven species of large brown algae.** J Phycol. 2023 Oct;59(5):859-878. Disponível em: doi: 10.1111/jpy.13377. Epub 2023 Sep 19. PMID: 37726938. Acesso em: 18 jan.2025.

MARQUES, Sâmia; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana. (2017). **Algas como bioindicadores da qualidade da água.** Revista Científica ANAP Brasil. 10. 10.17271/19843240101920171651. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321871946_Algas_como_bioindicadores_da_qualidade_da_agua/citation/download. Acesso em: 01 dez.2024.

MARTIN, M., BARBEYRON, T., MARTIN, R., PORTETELLE, D., MICHEL, G., VANDENBOL, M. **The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria.** Front Microbiol. 2015 Dec 24; 6:1487. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2015.01487. PMID: 26734000; PMCID: PMC4690005. Acesso em: 22 jan.2025.

MARTIN, M., PORTETELLE, D., MICHEL, G., VANDENBOL, M. **Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications.** Appl Microbiol Biotechnol. 2014 Apr;98(7):2917-35. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-014-5557-2. Epub 2014 Feb 22. PMID: 24562178. Acesso em: 21 jan.2025.

MARZINELLI, E.M., QIU, Z., DAFFORN, K.A., JOHNSTON, E.L., STEINBERG, P.D., MAYER-PINTO, M. **Coastal urbanisation affects microbial communities on a dominant marine holobiont**. NPJ Biofilms Microbiomes. 2018 Jan 17;4:1. Disponível em: doi: 10.1038/s41522-017-0044-z. PMID: 29367878; PMCID: PMC5772048. Acesso em 15 jan.2025.

MEDIPALLY, S.R., YUSOFF, F.M., BANERJEE, S., SHARIFF, M. (2015). **Microalgas como matéria-prima de energia renovável sustentável para produção de biocombustível**. BioMed research international, 2015 (1), 519513. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2015/519513>. Acesso em 19: dez. 2024.

MENAA, F.; WIJESINGHE P.; THIRIPURANATHAR, G.; UZAIR, B.; LQBAL, H.; KHAN, B.A.; MENAA, B. **Ecological and Industrial Implications of Dynamic Seaweed-Associated Microbiota Interactions**. Mar Drugs. 2020 Dec 14;18(12):641. doi: 10.3390/md18120641. PMID: 33327517; PMCID: PMC7764995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33327517/>. Acesso em: 20 out.2024.

MENON, V. (2011). Seaweed Polysaccharides - Food Applications. **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology**. 21. 541-555. Disponível em: 10.1002/9781119977087.ch36. Acesso em 07 jan. 2025.

MICHALAK, I., DMYTRYK, A., & CHOJNACKA, K. (2020). **Cosméticos de algas**. Enciclopédia de biotecnologia marinha, 1, 65-85. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119143802.ch3>. Acesso em: 18 dez. 2024.

MICHEL, G. CZJZEK, M. (2013). **Polysaccharide-degrading enzymes from marine bacteria**. Marine Enzymes for Biocatalysis, pg 429-464. Disponível em: 10.1533/9781908818355.3.429. Acesso em: 11 jan.2025.

MOTA, N. S., FIGUEIREDO, T. V. B., MACHADO, B. A. S., & DRUZIAN, J. I. (2014). **Macroalgas marinhas comestíveis: tendências tecnológicas**. Cadernos de

Prospecção, 7(2), 118-118. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/11335>. Acesso em 14 dez. 2024.

MUÑOZ-MIRANDA, Luis A.; IÑIGUEZ-MORENO, M. **Uma extensa revisão de pigmentos marinhos: fontes, aplicações biotecnológicas e sustentabilidade**. Aquatic Sciences, v. 85, n. 3, p. 68, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00027-023-00966-8>. Acesso em: 05 dez. 2024.

NAI, C. **Have you ever heard of Fanny Angelina Hesse?** Posted on July 18, 2024 at 01:30 AM in Odds & Ends. Disponível em: <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2024/07/have-you-ever-heard-of-fanny-angelina-hesse.html>. Acesso 07 jan.2025.

NAYAK, A.K., HASNAIN, M.S., PAL, D. (Eds.). (2019). **Polímeros naturais para aplicações farmacêuticas: Volume 2: Polímeros marinhos e microbiologicamente derivados** (1ª ed.). Apple Academic Press. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780429328299>. Acesso em: 08 jan.2025.

NGUYEN, T.T.H., VUONG, T.Q., HAN, H.L., et al. **Three marine species of the genus Fulvirga, rich sources of carbohydrate-active enzymes degrading alginate, chitin, laminarin, starch, and xylan**. Sci Rep. 2023 Apr 18;13(1):6301. doi: 10.1038/s41598-023-33408-4. PMID: 37072506; PMCID: PMC10113389.

OPPENHEIMER, M.; GLAVOVIC, B.; HINKEL, J.; VAN DE WAL, R.; MAGNAN, A. K.; ABD-ELGAWAD, A.; ... & SEBESVARI, Z. (2019). **Sea level rise and implications for low lying islands, coasts and communities**. Disponível em: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/9280>. Acesso em: 08 dez. 2024.

OTA, Ana C. M. et al. **Revisão Sistemática da Literatura do Potencial de Aplicação Biotecnológica das Algas**. 2021. Disponível em: <https://dspace.unila.edu.br/server/api/core/bitstreams/ffb47161-b27b-480f-bfb2-8bba7da3827a/content>. Acesso em: 17 dez. 2024.

PADMESH, S. SINGH, A. (2021). **Agars: Properties and Applications**. In Polysaccharides (eds Inamuddin, M.I. Ahamed, R. Boddula and T. Altalhi). Disponível em: 10.1002/9781119711414.ch5. Acesso em: 07 jan.2025.

PARK, N.J., YU, S., KIM, D.H., YUN, E.J., KIM, K.H. **Characterization of BpGH16A of Bacteroides plebeius, a key enzyme initiating the depolymerization of agarose in the human gut**. Appl Microbiol Biotechnol. 2021 Jan;105(2):617-625. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-020-11039-3. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33404831. Acesso em: 25 jan.2025.

PARK, S.H., LEE, C.R., HONG, S.K. **Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass**. Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Apr;104(7):2815-2832. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-020-10412-6. Epub 2020 Feb 8. PMID: 32036436. Acesso em: 12 jan.2025.

PEREIRA, Leonel. (2021). REVISTA DE CIÊNCIA ELEMENTAR **As algas na alimentação**. Revista de Ciência Elementar. 10.24927/rce2021.006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/349221573_REVISTA_DE_CIENCIA_ELEMENTAR_As_algas_na_alimentacao. Acesso 01 dez.2024.

PLUVINAGE, B., GRONDIN, J.M., AMUNDSEN, C. et al. **Molecular basis of an agarose metabolic pathway acquired by a human intestinal symbiont**. Nat Commun. 2018 Mar 13;9(1):1043. Disponível em: doi: 10.1038/s41467-018-03366-x. PMID: 29535379; PMCID: PMC5849685. Acesso em: 24 jan.2025.

POMIN, V.H. **Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review**. Glycoconj J. 2010 Jan;27(1):1-12. Disponível em: doi: 10.1007/s10719-009-9251-z. Epub 2009 Jul 1. PMID: 19568930. Acesso em: 06 jan.2025.

PORSE, H., RUDOLPH, B. **The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook**. J Appl Phycol 29, 2187–2200 (2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1144-0>. Acesso em: 07 jan.2025.

RAMANAN, R., KIM, B.H., CHO, D.H., OH, H.M., KIM, H.S. **Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications**. Biotechnol Adv. 2016 Jan-Feb;34(1):14-29. Disponível em: doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003. Epub 2015 Dec 3. PMID: 26657897. Acesso em: 16 jan.2025.

REN, C.G., LIU, Z.Y., WANG, X.L., QIN, S. **The seaweed holobiont: from microecology to biotechnological applications**. Microb Biotechnol. 2022 Mar;15(3):738-754. Disponível em: doi: 10.1111/1751-7915.14014. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35137526; PMCID: PMC8913876. Acesso em: 22 jan.2025.

RESEARCH, M.M. **Agar Market: In-Depth Examination of Global Patterns, Evolving Consumption Patterns, Competitive Scenario and Analysis of Influencing Trends in the Industry**. Size, Share, Growth Prospects, Forecast 2024-2030. Disponível em: <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/agar-market/199693/>. Acesso 08 jan. 2025.

ROMÃO, E. M., DE LIMA, R. P., (2021). **Empreendedorismo e inovação no Brasil: Biocombustíveis uma estratégia para o desenvolvimento. Meio Ambiente (Brasil)**, 3(2). Disponível em: <https://meioambientebrasil.com.br/index.php/MABRA/article/view/120>. Acesso em: 19 dez. 2024.

ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R., ZILBER-ROSENBERG, I. **The role of microorganisms in coral health, disease and evolution**. Nat Rev Microbiol. 2007 May;5(5):355-62. Disponível em: doi: 10.1038/nrmicro1635. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17384666. Acesso em: 13 jan.2025.

ROSENBERG, E., ZILBER-ROSENBERG, I. **Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept**. mBio. 2016 Mar 31;7(2):e01395. Disponível em: doi: 10.1128/mBio.01395-15. PMID: 27034283; PMCID: PMC4817260. Acesso em: 14 jan.2025.

ROSENBERG, E., ZILBER-ROSENBERG, I. **The hologenome concept of evolution after 10 years**. Microbiome. 2018 Apr 25;6(1):78. Disponível em: doi: 10.1186/s40168-018-0457-9. PMID: 29695294; PMCID: PMC5922317. Acesso em: 14 jan.2025.

SÁ, Ana Rita Fonseca. **Guia Ilustrado das Macroalgas da Baía de Buarcos**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra (Portugal). Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/af0b456f4f954dde1b94446fa3448b3b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>. Acesso em: 05 dez.2024.

SAHA, M., DITTAMI, S., CHAN, C. et al. **Progress and future directions for seaweed holobiont research**. New Phytologist. 244. 364-376. Disponível em: Doi: 10.1111/nph.20018. Acesso em: 17 jan.2025.

SAHA, M., GILÃO, P., VERHEGGEN, F. **Interações mediadas por voláteis com micróbios associados à superfície: Um paralelismo entre a filosfera de plantas e a eco-quimosfera de algas marinhas**. *J Ecol*. 2021; 109: 2823 – 2831. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13693>. Acesso em 17 jan.2025.

SCHROEDER, D.C., MCKEOWN, D.A. (2021). **Viruses of seaweeds**. In Studies in Viral Ecology, C.J. Hurst (Ed.). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119608370.ch4>. Acesso em: 19 jan.2025.

SHEN, J., DAN, M., LI, Y., TAO, X., ZHAO, G., WANG, D. **Controllable and complete conversion of agarose into oligosaccharides and monosaccharides by microwave-assisted hydrothermal and enzymatic hydrolysis and antibacterial activity of agaro-oligosaccharides**. *Int J Biol Macromol*. 2023 Nov 1; 251:126319. Disponível em: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126319. Epub 2023 Aug 14. PMID: 37582437. Acesso em: 11 jan.2025.

SILVA, N. B. A. D. (2021). **Assembleias epífitas em principais macroalgas e os efeitos do ambiente físico e dos poluentes no litoral de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPE_40e64bab025bc35dfb3f212d5c341a88. Acesso em: 10 dez. 2024.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; & PETROVICK, P. R. (2016). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=uo5vDQAAQBAJ&dq=Sim%C3%B5es+et+al,+2016&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s. Acesso 09 dez. 2024.

SINGH, R.P., REDDY, C.R. **Unraveling the Functions of the Macroalgal Microbiome**. Front Microbiol. 2016 Jan 5; 6:1488. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2015.01488. PMID: 26779144; PMCID: PMC4700259. Acesso em: 20 jan.2025.

SOARES, L. P.; FUJII, M. T. **Novas ocorrências de macroalgas marinhas bentônicas no estado de Pernambuco, Brasil**. Rodriguésia, Rio de Janeiro, n.3, p.557-570, 20 jul. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/rj/rod/a/YxgyRmXQLmLzt33mv9r7zvx/>. Acesso em: 18 dez. 2024.

SOUSA, A.M., MORAIS, S., ABREU, M.H., PEREIRA, R., SOUSA-PINTO, I., CABRITA, E.J., DELERUE-MATOS, C., GONÇALVES, M.P. **Structural, physical, and chemical modifications induced by microwave heating on native agar-like galactans**. J Agric Food Chem. 2012 May 16;60(19):4977-85. Disponível em: doi: 10.1021/jf2053542. Epub 2012 May 8. PMID: 22540146. Acesso em: 09 jan.2025

STEIGLEDER, K. **Estrutura das comunidades de macroalgas no mesolitoral rochoso do Atlântico Sudoeste Central (26°S-34°S)**. 2015. Disponível em: <https://sistemas.furg.br/sistemas/sab/arquivos/bdtd/0000010625.pdf>. Acesso em: 10 dez.2024.

STEVENS, K., WEYNBERG, K., BELLAS, C., et al. **A novel evolutionary strategy revealed in the phaeoviruses**. PLoS One. 2014 Jan 21;9(1):e86040. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0086040. PMID: 24465858; PMCID: PMC3897601. Acesso em: 19 jan.2025.

SUN, H., GAO, L., XUE, C., MAO, X. **Marine-polysaccharide degrading enzymes: status and prospects.** *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19: 2767–2796.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12630>. Acesso em: 06 jan.2025.

TANG, D.Y.Y., KHOO, K, S., CHEW, K.W., TAO, Y., HO, S.H., SHOW, P.L., **Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products.** *Bioresour Technol.* 2020 May; 304:122997. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122997. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32094007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094007/>. Acesso em: 17 dez. 2024.

TEIXEIRA, V. L. **Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas.** *Rev. Virtual Quim.*, 2013, 5 (3), 343-362. Disponível em: <https://rvq.sbq.org.br/pdf/v5n3a03>. Acesso em: 03 dez.2024.

TIMANIKOVA, N., FLETCHER, K., HAN, J.W. et al. **Macroalgal eukaryotic microbiome composition indicates novel phylogenetic diversity and broad host spectrum of oomycete pathogens.** *Environ Microbiol.* 2024 Jun;26(6):e16656. Disponível em: doi: 10.1111/1462-2920.16656. PMID: 38818657. Acesso em 18 jan.2025.

TORRES, M.D., FLÓREZ-FERNÁNDEZ, N., DOMÍNGUEZ, H. **Integral Utilization of Red Seaweed for Bioactive Production.** *Mar Drugs.* 2019 May 28;17(6):314. Disponível em: doi: 10.3390/md17060314. PMID: 31142051; PMCID: PMC6627364. Acesso em: 09 jan.2025.

TRINCONE, A. **Update on Marine Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes: Biotechnological Applications.** *Molecules.* 2018 Apr 13;23(4):901. Disponível em: doi: 10.3390/molecules23040901. PMID: 29652849; PMCID: PMC6017418. Acesso em: 06 jan.2025.

UANG, L., ZHANG, H., WU, P., ENTWISTLE, S., LI, X., YOHE, T., YI, H., YANG, Z., YIN, Y. **dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation.** *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D516–D521. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx894>. Acesso em: 03 jan.2025.

USOV, A.I. **Polysaccharides of the red algae**. Adv Carbohydr Chem Biochem. 2011; 65:115-217. Disponível em: doi: 10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2. PMID: 21763512. Acesso em: 09 jan.2025.

VANWONTERGHEM, I., WEBSTER, N.S. **Coral Reef Microorganisms in a Changing Climate**. iScience. 2020 Apr 24;23(4):100972. Disponível em: doi: 10.1016/j.isci.2020.100972. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32208346; PMCID: PMC7096749. Acesso em: 15 jan.2025.

VEERAKUMAR, S., MANIAN, R.P. **β -agarases: insights into molecular, biochemical, and physiochemical characteristics**. 3 *Biotech* 8, 445 (2018). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1470-1>. Acesso em 12 jan.2025.

VIANA, D. L. et al. **Ciências do mar: dos oceanos do mundo ao nordeste do Brasil: bioecologia, pesca e aquicultura**. volume 2 / [editores]Danielle de Lima Viana ... [et al.]. -- 1. ed. -- Olinda, PE: Via Design Publicações, 2021.

VIBORG, A.H., TERRAPON, N., LOMBARD, V., MICHEL, G., CZJZEK, M., HENRISSAT, B., BRUMER, H. **A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16)**. J Biol Chem. 2019 Nov 1;294(44):15973-15986. Disponível em: doi: 10.1074/jbc.RA119.010619. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31501245; PMCID: PMC6827312. Acesso em: 23 jan.2025.

WEXLER, A., GOODMAN, A. **An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome**. *Nat Microbiol* 2, 17026 (2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>. Acesso em: 02 jan.2025.

WILKENS, C., TIWARI, M.K., WEBB, H., JAM, M., CZJZEK, M., SVENSSON, B. **Asp271 is critical for substrate interaction with the surface binding site in β -agarase a from *Zobellia galactanivorans***. *Proteins*. 2019 Jan;87(1):34-40. Disponível em: doi: 10.1002/prot.25614. Epub 2018 Nov 4. PMID: 30315603. Acesso em: 24 jan.2025.

WU, Y., ZHANG, M., ZHONG, M., HU, Z. **Synergistic enzymatic saccharification and fermentation of agar for biohydrogen production.** Bioresource Technology. Volume 241. 2017. Pages 369-373. ISSN 0960-8524. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.117>. Acesso em: 29 jan.2025.

YOU, Y., XIE, W., LI, C., GU, Z., BAN, X., ZHANG, F., LI, Z. (2023). **Characterization and efficient production of an α -agarase from marine bacterium *Catenovulum maritimum* STB14.** *Food Bioengineering*, 2, 3–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fbe2.12037>. Acesso em: 26 jan.2025.

YU, S., PARK, S.Y., KIM, D.H., YUN, E.J., KIM, K.H. **Multi-Step Enzymatic Production and Purification of 2-Keto-3-Deoxy-Galactonate from Red-Macroalgae-Derived Agarose.** *Mar Drugs*. 2022 Apr 25;20(5):288. Disponível em: doi: 10.3390/md20050288. PMID: 35621939; PMCID: PMC9147760. Acesso em: 25 jan.2025.

YUN, E.J., CHOI, I.G., KIM, K.H. (2015). **Macroalgas vermelhas como um recurso sustentável para produtos de base biológica.** *Tendências em Biotecnologia*, 33 (5), 247-249. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.006>. Acesso em: 28 jan.2025.

YUN, E.J., KIM, H.T., CHO, K.M., YU, S., KIM, S., CHOI, I.G., KIM, K.H. **Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars.** *Bioresour Technol*. 2016 Jan; 199:311-318. Disponível em: doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.001. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26276401. Acesso em: 28 jan.2025.

YUN, E.J., LEE, S., KIM, S., RYU, H.S., KIM, K. (2024). **Catabolism of 2-keto-3-deoxy-galactonate and the production of its enantiomers.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. Disponível em: doi:10.1007/s00253-024-13235-x. Acesso em: 30 jan.2025.

YUN, E.J., YU, S., KIM, K.H. **Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017

Jul;101(14):5581-5589. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-017-8383-5. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28656380. Acesso em: 10 jan.2025.

ZARRINTAJ, P., MANOUCHEHRI, S., AHMADI, Z., SAEB, M.R., URBANSKA, A.M., KAPLAN, D.L., MOZAFARI, M. **Agarose-based biomaterials for tissue engineering. Carbohydr Polym.** 2018 May 1;187:66-84. Disponível em: doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.060. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29486846. Acesso em: 08 jan.2025.

ZENG, X., TIAN, Y., KONG, H., et al. **Catalytic Mode and Product Specificity of an α -Agarase Reveal Its Direct Catalysis for the Production of Agarooligosaccharides.** Foods. 2024 Jul 26;13(15):2351. Disponível em: doi: 10.3390/foods13152351. PMID: 39123543; PMCID:PMC11311870. Acesso em: 26 jan.2025.

ZHANG, K., ZHANG, F., WU, Y.R. **Emerging technologies for conversion of sustainable algal biomass into value-added products: A state-of-the-art review.** Sci Total Environ. 2021 Aug 25;784:147024. Disponível em: doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147024. Epub 2021 Apr 20. PMID: 33895504. Acesso em: 27 jan.2025.

ZHAO, J., NAIR, S., ZHANG, Z., WANG, Z., JIAO, N., ZHANG, Y. **Macroalgal virosphere assists with host-microbiome equilibrium regulation and affects prokaryotes in surrounding marine environments.** ISME J. 2024 Jan 8;18(1):wrae083. Disponível em: doi: 10.1093/ismejo/wrae083. PMID: 38709876; PMCID: PMC11126160. Acesso em: 20 jan.2025.

ZILBER-ROSENBERG, I., ROSENBERG, E. **Microbial-driven genetic variation in holobionts.** FEMS Microbiol Rev. 2021 Nov 23;45(6):fuab022. Disponível em: doi: 10.1093/femsre/fuab022. PMID: 33930136. Acesso em 15 jan.2025

9. ANEXOS

Anexo 1 - Meios de cultura

Água do mar artificial (ASW)

NaCl	23,38 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,93 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,07 g
CaCl ₂ .H ₂ O	1,47 g
KCl	0,75 g
NaHCO ₃	0,17 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Meio de Hu (Hu et al., 2008)

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

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

Caldo Marine

Peptona	5 g
---------	-----

Extrato de Levedura	1 g
---------------------	-----

Sal Marinho	33,3 g
-------------	--------

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

Ágar Marine

Peptona	5 g
---------	-----

Extrato de Levedura	1 g
---------------------	-----

Sal Marinho	33,3 g
-------------	--------

Ágar	15 g
------	------

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

Ágar Marine 1:10

Peptona	0,5 g
---------	-------

Extrato de Levedura	0,1 g
---------------------	-------

Sal Marinho	3,33 g
-------------	--------

Ágar	1,5 g
------	-------

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

LB

Peptona	10 g
---------	------

Extrato de Levedura	5 g
---------------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

Ágar	15 g
------	------

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

Meio Mínimo Marine (Thomas et al., 2016)

NaCl	24,7 g
------	--------

MgSO ₄ .7H ₂ O	6,3 g
--------------------------------------	-------

MgCl ₂ .6H ₂ O	4,6 g
--------------------------------------	-------

NH ₄ Cl	2 g
--------------------	-----

KCl	0,7 g
-----	-------

CaCl ₂ .H ₂ O	0,6 g
-------------------------------------	-------

NaHCO ₃	0,2 g
--------------------	-------

K ₂ HPO ₄	0,1 g
---------------------------------	-------

Extrato de Levedura	0,05 g
---------------------	--------

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
H_2O destilada	1000 mL

Meio Mínimo Marine + Agarose

NaCl	24,7 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,3 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,6 g
NH_4Cl	2 g
KCl	0,7 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,6 g
NaHCO_3	0,2 g
K_2HPO_4	0,1 g
Extrato de Levedura	0,05 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Agarose	10 g
H_2O destilada	1000 mL

Meio Mínimo Marine + Alginato

NaCl	24,7 g
------	--------

MgSO ₄ ·7H ₂ O	6,3 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4,6 g
NH ₄ Cl	2 g
KCl	0,7 g
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,6 g
NaHCO ₃	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
Extrato de Levedura	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g
Alginato	10 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Meio Mínimo Marine + Óleo Mineral

NaCl	24,7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6,3 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4,6 g
NH ₄ Cl	2 g
KCl	0,7 g
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,6 g

NaHCO_3	0,2 g
K_2HPO_4	0,1 g
Extrato de Levedura	0,05 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Óleo Mineral	10 mL
H_2O destilada	1000 mL