



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Maria Eduarda Rossi Mello

**Avaliação fenotípica da atividade de enzimas extracelulares produzidas por
Bacillus spp. isolados de cama de aviário**

Florianópolis
2025

Maria Eduarda Rossi Mello

**Avaliação fenotípica da atividade de enzimas extracelulares produzidas por
Bacillus spp. isolados de cama de aviário**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro
Coorientador: MSc. Gustavo Rocha

Florianópolis

2025

Mello, Maria Eduarda Rossi

Avaliação fenotípica da atividade de enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus* spp. isolados de cama de aviário / Maria Eduarda Rossi Mello ; orientadora, Jussara Kasuko Palmeiro, coorientador, Gustavo Rocha, 2025.
69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia. 3. *Bacillus* spp.. 4. Enzimas extracelulares. 5. Potencial biotecnológico. I. Palmeiro, Jussara Kasuko. II. Rocha, Gustavo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Maria Eduarda Rossi Mello

Avaliação fenotípica da atividade de enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus* spp. isolados de cama de aviário

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Bacharel em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 24 de novembro de 2025.

Insira neste espaço
a assinatura

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Insira neste espaço
a assinatura

Prof.^aDr.^a Jussara Kasuko Palmeiro

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Insira neste espaço
a assinatura

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte

Universidade Federal de Santa Catarina

Insira neste espaço
a assinatura

MSc. Anderson Giehl

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Thais, pelo seu esforço há 23 anos para criar a pessoa que eu sou hoje, pelo apoio e amor imensurável que fizeram eu chegar até aqui. Agradeço também à minha família, pelo carinho e incentivo de seguir em frente sempre.

Agradeço aos meus amigos, por estarem presentes nessa caminhada, pelos momentos de descontração em meio a tudo, especialmente minhas amigas Marina, Sofia, Beatriz e Isabella, obrigada pelo suporte e companhia em todos os momentos.

Agradeço também meu amigo Rafael, meu parceiro de curso, só nós sabemos tudo que passamos nesses 4 anos, os incontáveis trabalhos e provas que estudamos juntos.

Agradeço imensamente ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada, o MiMA, que me acolheu há 3 anos e me fez crescer como pessoa e como cientista, foi a melhor escolha que eu poderia ter feito. Agradeço às coordenadoras Jussara e Thais, por seus ensinamentos e carinho com os “mimers”.

Agradeço especialmente à Julia, Luana, Sabrina, Gabriel, Victor, Mateus, Izadora e Kharol, por estarem sempre presentes, me ajudarem nos experimentos, e me darem suporte fora do laboratório também, vocês são especiais.

Agradeço ao meu coorientador Gustavo, meu “pai” científico, por nunca largar minha mão e me fazer pensar, ter olhar crítico, resolver problemas, e pelos conselhos que vão além do campo científico. Obrigada por ser um pai presente e disposto a tirar minhas dúvidas.

Por fim, agradeço à UFSC por me acolher nesses 4 anos de curso, pelas oportunidades e experiências únicas, pelo ensino, os desafios e pelas pessoas que conheci pelo caminho.

RESUMO

A crescente demanda por processos sustentáveis tem impulsionado a busca por microrganismos capazes de produzir enzimas extracelulares com potencial de aplicação industrial, agrícola e ambiental. Nesse contexto, espécies do gênero *Bacillus* destacam-se pela alta capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas, estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura e facilidade de cultivo em meios econômicos, o que as torna candidatas estratégicas para bioprocessos associados à economia circular. Considerando esse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial enzimático de 61 isolados do gênero *Bacillus* obtidos de cama de aviário, visando identificar microrganismos com perfil promissor para aplicações biotecnológicas. Foram realizados ensaios qualitativos em meios enzima-específicos para detecção de alfa-amilase, celulase, esterase, fitase, lipase e protease. A atividade foi inferida pela formação de zonas de degradação ao redor das colônias, utilizada para o cálculo do índice enzimático (I.E.), e os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA bifatorial, considerando a espécie bacteriana, o tipo de enzima e a interação entre esses fatores. Essa abordagem permitiu comparar, de forma integrada, a frequência de isolados positivos, a intensidade relativa das atividades e a existência de padrões metabólicos específicos entre as espécies. Todos os isolados apresentaram atividade positiva para ao menos uma enzima, confirmando o elevado potencial enzimático da microbiota associada à cama de aviário. Protease, alfa-amilase e fitase foram as atividades mais frequentes, destacando-se a protease, detectada em 100% dos isolados. Em contraste, celulase, esterase e, sobretudo, lipase exibiram menor proporção de isolados positivos, sendo a atividade lipolítica observada em apenas 10,81% dos isolados. As espécies *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis* apresentaram os perfis mais promissores, combinando maiores índices enzimáticos e maior diversidade de atividades, especialmente para alfa-amilase, protease e lipase. A ANOVA indicou efeito significativo da espécie, do tipo de enzima e da interação espécie–enzima sobre o índice enzimático, evidenciando diferenças funcionais relevantes entre as combinações avaliadas. De forma geral, os resultados reforçam a cama de aviário como uma fonte estratégica de *Bacillus* produtores de enzimas extracelulares com potencial de uso em formulações enzimáticas, biorremediação, nutrição animal e outros processos sustentáveis. Além disso, apontam isolados prioritários para estudos futuros de identificação molecular, otimização da produção enzimática e validação em condições de processo, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas alinhadas às demandas atuais por maior sustentabilidade na cadeia produtiva avícola e em setores correlatos.

Palavras-chave: *Bacillus* spp.; bioprospecção; enzimas extracelulares.

ABSTRACT

The increasing demand for sustainable processes has driven the search for microorganisms capable of producing extracellular enzymes with potential for industrial, agricultural, and environmental applications. In this context, species of the genus *Bacillus* stand out due to their high capacity for secreting hydrolytic enzymes, stability over a wide range of pH and temperature, and ease of cultivation in cost-effective media, making them strategic candidates for bioprocesses associated with the circular economy. Considering this scenario, the present study aimed to evaluate the enzymatic potential of 61 isolates of the genus *Bacillus* obtained from poultry litter, aiming to identify microorganisms with promising profiles for biotechnological applications. Qualitative assays were carried out in enzyme-specific media to detect alpha-amylase, cellulase, esterase, phytase, lipase, and protease. Activity was inferred by the formation of degradation zones around the colonies, which was used to calculate the enzymatic index (I.E.), and the data were subjected to statistical analysis by two-way ANOVA, considering bacterial species, enzyme type, and the interaction between these factors. This approach allowed for the integrated comparison of the frequency of positive isolates, the relative intensity of the activities, and the existence of specific metabolic patterns among the species. All isolates exhibited positive activity for at least one enzyme, confirming the high enzymatic potential of the microbiota associated with poultry litter. Protease, alpha-amylase, and phytase were the most frequent activities, with protease standing out, detected in 100% of the isolates. In contrast, cellulase, esterase, and especially lipase exhibited a lower proportion of positive isolates, with lipolytic activity observed in only 10.81% of the isolates. The species *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus velezensis* presented the most promising profiles, combining higher enzymatic indices and greater activity diversity, especially for alpha-amylase, protease, and lipase. The ANOVA indicated a significant effect of species, enzyme type, and the species-enzyme interaction on the enzymatic index, highlighting relevant functional differences between the combinations evaluated. Overall, the results reinforce poultry litter as a strategic source of *Bacillus* strains producing extracellular enzymes with potential use in enzyme formulations, bioremediation, animal nutrition, and other sustainable processes. Moreover, they highlight priority isolates for future studies on molecular identification, optimization of enzymatic production, and process condition validation, contributing to the development of biotechnological alternatives aligned with the current demand for greater sustainability in the poultry production chain and related sectors.

Keywords: *Bacillus* spp.; bioprospecting; extracellular enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação da alfa-amilase	19
Figura 2 - Mecanismo de ação da celulase	21
Figura 3 - Mecanismo de ação da esterase	24
Figura 4 - Mecanismo de ação da fitase	27
Figura 5 - Mecanismo de ação da lipase	28
Figura 6 - Mecanismo de ação da protease	29
Figura 7 - Teste enzimático de alfa-amilase	35
Figura 8 - Teste enzimático de esterase	35
Figura 9 - Teste enzimático de fitase	36
Figura 10 - Teste enzimático de protease	36
Figura 11 - Teste enzimático de lipase	37
Figura 12 - Distribuição de isolados positivos e negativos para os testes enzimáticos	39
Figura 13 - Heatmap do índice enzimático dos isolados testados	43
Figura 14 - Média dos índices enzimáticos das espécies analisadas	44
Figura 15 - Análise estatística da interação espécie-enzima	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos isolados	31
Tabela 2 – Resultados análise estatística ANOVA	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
LB	Luria-Bertani
UV	Ultravioleta
I.E	Índice enzimático
CMC	Carboximetilcelulose
ANOVA	Análise de variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Prospecção de microrganismos	15
3.2	Cama de aviário	16
3.3	<i>Bacillus</i> spp.	17
3.4	Alfa-amilase	19
3.5	Celulase	21
3.6	Esterase	23
3.7	Fitase	25
3.8	Lipase	27
3.9	Protease	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Isolamento e identificação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	30
4.2	Preparo dos isolados para os testes enzimáticos	32
4.3	Composição e preparo de meios de cultura específicos para os testes de atividade enzimática extracelular	32
4.3.1	Teste para atividade de alfa-amilase	32
4.3.2	Teste para atividade de celulase	33
4.3.3	Teste para atividade de esterase	33
4.3.4	Teste para atividade de fitase	33
4.3.5	Teste para atividade de lipase	33
4.3.6	Teste para atividade de protease	34
4.4	Interpretação da leitura dos testes enzimáticos	34
4.5	Cálculo do Índice Enzimático	37
4.6	Análise estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A demanda global por práticas mais sustentáveis em diversos setores, como o agrícola, o ambiental e o industrial, impulsionou a busca por alternativas inovadoras e de baixo impacto ambiental. Nesse cenário, a biotecnologia microbiana emergiu como uma ferramenta promissora, capaz de gerar soluções aplicáveis em diferentes áreas (LOPES et al., 2021). Além disso, o emprego de microrganismos é uma alternativa biotecnológica para redução da dependência de insumos químicos, otimizar processos e contribuir para a segurança alimentar (CHOUHAN et al., 2021; HESHAM et al., 2021). Essa biotecnologia é benéfica, pois promove maior eficiência produtiva, incrementa a qualidade de produtos e ainda aumenta a resistência dos sistemas biológicos frente a diferentes estresses, sejam eles bióticos ou abióticos (LOPES et al., 2021).

Microrganismos, que constituem cerca de 60% da biomassa total do planeta (ALVES, 2018), representam um vasto reservatório de recursos com potencial biotecnológico. A diversidade metabólica de bactérias, acumulada ao longo de 3,8 bilhões de anos de evolução, permite a prospecção de compostos de interesse em diferentes áreas industriais (ALVES, 2018). A exploração dessa biodiversidade em busca de novos recursos de relevância social e econômica é conhecida como bioprospecção (VESTER; GLARING; STOUGAARD, 2014), prática que tem contribuído significativamente para avanços em setores como agricultura, indústria farmacêutica, biorremediação e bioenergia (ALVES, 2018; BERNAL, 2020; PROCÓPIO E BARRETO, 2021).

Entre os microrganismos mais estudados, o gênero *Bacillus* se destaca por sua versatilidade e robustez. Essas bactérias são Gram-positivas, catalase-positivas e aeróbias ou anaeróbias facultativas, com ampla distribuição em ambientes como solo, água e trato intestinal de animais (TARIQ et al., 2025). Tal gênero possui a capacidade de formar esporos, conferindo elevada resistência a condições ambientais adversas, assegurando sua sobrevivência em comparação ao estado vegetativo (ZHANG et al., 2025). Além disso, são capazes de secretar diversas substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas e antibióticos lipopeptídicos, e apresentam rápido crescimento aliado a condições simples de cultivo, o que favorece sua aplicação em diferentes indústrias (KAMILARI et al., 2025; NARMUKHAMEDOVA et al., 2025).

O potencial industrial de *Bacillus* reside principalmente na produção de enzimas, macromoléculas biológicas que atuam como biocatalisadores altamente eficientes. Essas proteínas reduzem a energia de ativação das reações químicas, acelerando a conversão do substrato em produto e tornando possível a realização de reações essenciais em tempo viável (ALMEIDA, 2024; ISLAM et al., 2019). Um diferencial em relação a catalisadores químicos é a elevada especificidade, que assegura a transformação de um substrato específico sem a formação de subprodutos indesejados (ISLAM et al., 2019). Estima-se que mais de 2.000 enzimas já tenham sido descritas, cada uma com funções distintas, com base em seu potencial catalítico, as aplicações das enzimas se estendem a setores como de alimentos, bebidas, fármacos, têxteis e detergentes (ISLAM et al., 2019). As enzimas de origem microbiana, em especial as extracelulares, têm ampla aplicação industrial devido à facilidade de produção em grandes quantidades, estabilidade em condições extremas e baixo custo de obtenção (GOPINATH et al., 2017).

Espécies do gênero *Bacillus* são descritas pela produção de diferentes enzimas, como amilases, proteases, lipases, celulases, xilanases e fitases, dentre outras (ACHARYA; SUBEDI, 2025; DANILOVA; SHARIPOVA, 2020; HERNANDEZ-PATLAN et al., 2022). Essas enzimas apresentam aplicações diversas: proteases em detergentes, amilases na indústria cervejeira e de alimentos, lipases na produção de biodiesel, celulases na conversão de biomassa lignocelulósica e fitases como aditivos em rações animais (SINGH et al., 2016; GUPTA et al., 2023). Diversos estudos também têm investigado estratégias para otimizar a produção enzimática em *Bacillus*. Fatores como composição do meio, fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e aeração, influenciam diretamente na produtividade e no custo do processo (BOUZAIENE et al., 2023). O aperfeiçoamento dessas condições é essencial para tornar a produção industrial mais eficiente e economicamente viável, especialmente em processos de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato (BOUZAIENE et al., 2023).

A especificidade estrutural das enzimas, determinada pelo sítio ativo e pela conformação tridimensional, assegura seletividade na interação com substratos (BERNAL, 2020; CAMPOS E OLIVEIRA, 2020). Essa característica confere vantagem evolutiva aos microrganismos, pois a secreção extracelular de enzimas

permite acessar nutrientes complexos presentes no ambiente (SUMI et al., 2015; GOPINATH et al., 2017). A diversidade de condições físico-químicas encontradas em ambientes como solos agrícolas e camas de aviário exerce pressão seletiva sobre *Bacillus* spp., favorecendo a adaptação enzimática a amplas faixas de pH, temperatura e disponibilidade de substratos (DIAZ-CHUQUIZUTA et al., 2025; SAEED et al., 2025). Essa plasticidade adaptativa, adquirida em ambientes naturalmente heterogêneos, torna as enzimas produzidas por esses microrganismos particularmente promissoras para aplicações em contextos distintos daqueles de origem, incluindo processos de biorremediação e estratégias de manejo ambiental sustentável (KULKARNI; JAIN; BABU, 2025; WRÓBEL et al., 2023).

A capacidade de adaptação enzimática observada em *Bacillus* spp. fundamenta-se em mecanismos de regulação da expressão gênica que respondem a estímulos ambientais, modulando a síntese e secreção de enzimas de acordo com a disponibilidade de substratos e as condições do meio (CUESTA et al., 2015; ALVES, 2018). Assim, alterações nas condições ambientais podem induzir ajustes no metabolismo microbiano, resultando em inovação ou reorientação de funções metabólicas (CUESTA et al., 2015; ALVES, 2018).

Assim, a diversidade enzimática de *Bacillus* representa tanto uma resposta adaptativa quanto um recurso estratégico para biotecnologia. A prospecção dessas bactérias em ambientes ricos em matéria orgânica, como solos agrícolas e resíduos animais, tem se mostrado uma estratégia promissora para a descoberta de novas enzimas e metabólitos de interesse, reforçando seu papel como ferramenta essencial no desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis (SARWAN et al., 2024; RUTKOWSKA; MAURYCY DAROCH; MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, 2025; WU et al., 2025).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade de enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus* spp. por meio de testes qualitativos e fenotípicos, com o propósito de identificar microrganismos com potencial biotecnológico.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença de atividade enzimática em diferentes espécies de *Bacillus* isolados de cama de aviário.
- Determinar a atividade de enzimas extracelulares (alfa-amilase, celulase, esterase, fitase, lipase e protease), a partir de testes fenotípicos baseados no cultivo em meios de cultura específicos.
- Verificar se o comportamento enzimático varia de acordo com a espécie bacteriana, o tipo de enzima e a interação entre esses fatores.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prospecção de microrganismos

A bioprospecção microbiana, com o objetivo de identificar microrganismos com potencial biotecnológico, tem se consolidado como um campo promissor na biotecnologia, focando na exploração de recursos biológicos para a produção de compostos de interesse comercial, como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, metabólitos secundários e biopolímeros, que possuem diversas aplicações industriais e farmacêuticas (DIXIT et al., 2025). Microrganismos provenientes de diferentes ecossistemas, como solos, águas e ambientes extremos, possuem uma diversidade metabólica singular e capacidades adaptativas que tornam possível sua utilização em diversas aplicações industriais, farmacêuticas, agrícolas e ambientais (DIXIT et al., 2025). As amostras ambientais, incluindo solo, sedimentos, água e rizosfera das plantas, atuam como reservatórios ricos em novas cepas microbianas, que apresentam notável potencial enzimático, propriedades antimicrobianas e produção de compostos bioativos, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas inovadoras (DIXIT et al., 2025).

Entre os principais focos da bioprospecção está a identificação de enzimas de relevância industrial. Enzimas como proteases, lipases, amilases e celulases, isoladas de microrganismos ambientais, têm sido amplamente adotadas em indústrias de processamento de alimentos, formulação de detergentes e produção de biocombustíveis. (DIXIT et al., 2025; BECKER & WITTMANN, 2020). Além disso, a biorremediação tem se consolidado como uma área crítica onde a bioprospecção microbiana desempenha um papel essencial, visto que microrganismos isolados de ambientes poluídos demonstram um potencial notável para biodegradar e biotransformar contaminantes tóxicos, oferecendo soluções ecológicas para a gestão de resíduos e a conservação ambiental (MAGLIONE et al., 2024; SHAH et al., 2024). A busca por microrganismos capazes de degradar compostos recalcitrantes, como hidrocarbonetos e metais pesados, é essencial para a criação de soluções sustentáveis para o tratamento de ambientes contaminados, contribuindo para o cumprimento das metas de desenvolvimento sustentável da ONU (VUONG et al., 2022). O crescente uso dessas soluções no setor industrial demonstra o poder transformador da bioprospecção microbiana, que não só auxilia na redução da poluição, mas também no avanço de várias indústrias sustentáveis.

3.2 Cama de aviário

A cama de aviário constitui uma matriz complexa de resíduos agroindustriais: maravalha, casca de arroz, sabugo de milho, casca de café e outros subprodutos, que proporcionam vasta disponibilidade de nutrientes e compostos orgânicos (GIGRÔ - SERVIÇOS INTERATIVOS, 2024). Essa heterogeneidade de substratos sustenta alta riqueza microbiana, onde diferentes populações competem intensamente por carbono, nitrogênio e minerais, desenvolvendo estratégias metabólicas diversificadas, como a expressão de enzimas hidrolíticas e antimicrobianas para explorar nichos específicos ou inibir competidores (AGUILAR-PAREDES et al., 2023).

Além disso, práticas de manejo como a aplicação de cal virgem elevam o pH a níveis extremos, enquanto aeração e variações na umidade e temperatura impõem estresses físico-químicos que selecionam cepas resilientes, capazes de produzir enzimas estáveis em amplas faixas de pH e temperatura (MELLO, 2021; ROSA,

2022). A pressão seletiva adicional promovida pelo uso prolongado de antimicrobianos na produção intensiva favorece a emergência de metabólitos e mecanismos de resistência, enriquecendo ainda mais o repertório genético e enzimático dessas populações (OLIVEIRA, 2019; ABREU et al., 2023). Dessa forma, a combinação de diversidade de nutrientes, competição e condições extremas faz da cama de aviário um ambiente de prospecção privilegiado, onde microrganismos adaptados manifestam metabólitos e enzimas inovadoras com elevado potencial biotecnológico em biorremediação, biocatálise e desenvolvimento de bioinoculantes (DUMAS et al., 2011; MSHELIA MUSA SAIDU et al., 2024).

3.3 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, catalase-positivas e aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de formar endósporos altamente resistentes que lhes conferem notável sobrevivência em condições ambientais extremas, como variações de pH, temperatura e salinidade (TARIQ et al., 2025). O primeiro representante descrito, *Bacillus subtilis*, identificado por Ferdinand Cohn em 1872, consolidou-se como um dos modelos mais estudados da biologia celular e molecular bacteriana (ERRINGTON; VAN DER AART, 2020). Atualmente, o gênero compreende mais de 2500 espécies reconhecidas, muitas delas amplamente distribuídas em solos, águas e outros ambientes naturais, refletindo sua versatilidade ecológica e fisiológica (ABDEL-MONEIM et al., 2020).

Diversas espécies de *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*, possuem o status GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) e QPS (Presunção Qualificada de Segurança), sendo amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, agrícola e ambiental (FDA, 2023; FDA, 2024). O gênero destaca-se por sua elevada capacidade de secreção proteica (AMIN et al., 2025) e pela habilidade de crescer em diferentes substratos, inclusive resíduos agroindustriais, o que o torna um microrganismo-chave para a bioeconomia e para processos de valorização de coprodutos (KHARDZIANI et al., 2017; RODRÍGUEZ et al., 2019). Além disso, cepas de *Bacillus* podem ser cultivadas em fermentações

submersas ou em estado sólido, otimizando a produção de biomoléculas e reduzindo custos operacionais (VANDENBERGHE et al., 2020).

O gênero *Bacillus* destaca-se pelo notável potencial biotecnológico, sobretudo em razão de sua capacidade de sintetizar uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas de grande interesse industrial e ambiental (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; GU et al., 2018; PARK et al., 2021). Entre essas enzimas, as proteases de *Bacillus* têm sido amplamente empregadas em formulações de detergentes e na indústria de processamento de proteínas, devido à elevada especificidade e estabilidade em pH alcalino (CONTESINI; MELO; SATO, 2018). As amilases bacterianas, incluindo alfa-amilases e glucoamilases, são essenciais na conversão de amido em açúcares fermentescíveis, viabilizando a produção de xarope de maltose e bioetanol, bem como processos de modificação de amido na indústria de alimentos (GU et al., 2018). As lipases de *Bacillus* exibem alta atividade em interfaces óleo-água, tornando-se candidatas ideais para a síntese de ésteres, a produção de biocombustíveis de segunda geração e o tratamento de efluentes oleosos por biorremediação (PARK et al., 2021).

Além disso, as celulasas promovem a degradação de celulose em açúcares simples, contribuindo para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos na produção de bioetanol de segunda geração (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; GU et al., 2018), enquanto as fitases liberam fósforo de fitato em rações animais, melhorando a biodisponibilidade de minerais e reduzindo o impacto ambiental do fósforo em sistemas aquáticos (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; GU et al., 2018; PARK et al., 2021). Paralelamente ao arsenal enzimático, espécies de *Bacillus* apresentam comprovadas propriedades probióticas: a capacidade de esporulação confere excepcional viabilidade celular durante o processamento e o armazenamento, facilitando a incorporação em alimentos funcionais e suplementos nutricionais (CUTTING, 2011; ELSHAGHABEE et al., 2017).

Esses microrganismos são considerados seguros e eficazes, pois além de resistirem a condições adversas do trato gastrointestinal, produzem substâncias antimicrobianas e metabólitos benéficos ao hospedeiro (KUEBUTORNYE et al., 2019). Os *Bacillus* produzem uma ampla gama de metabólitos, como lipopeptídeos e

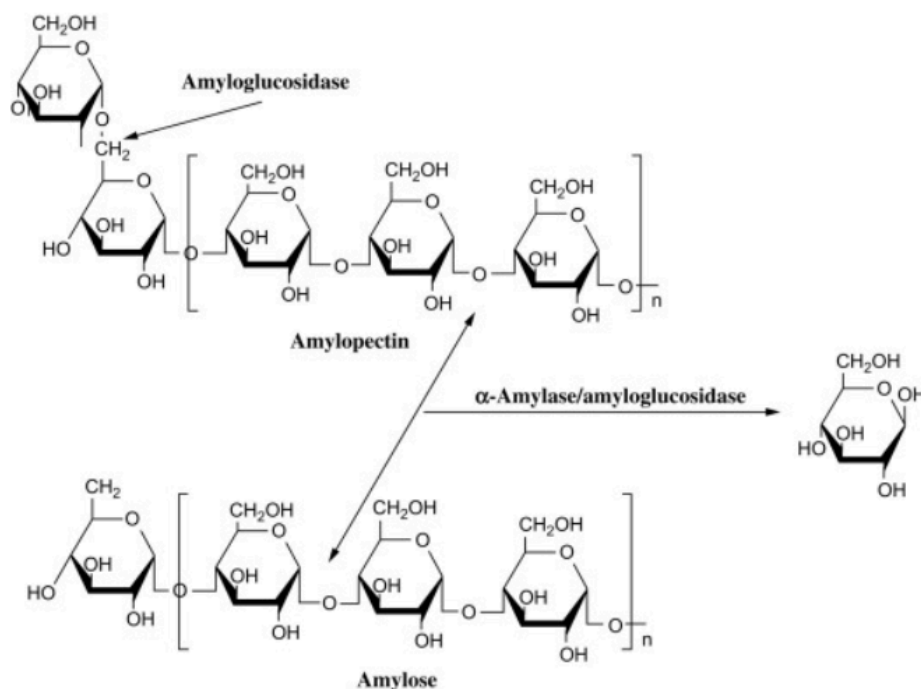
biossurfactantes, além de enzimas hidrolíticas (quitinases, glucanases), que lhes conferem aplicações em biorremediação de solos e águas contaminadas, biocontrole de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal como PGPB (KASPAR et al., 2019; MILJAKOVIĆ et al., 2020; ORTIZ et al., 2024).

Por fim, a integração de *Bacillus* em processos industriais e agrícolas representa um avanço em direção a uma bioeconomia circular, na qual resíduos são transformados em insumos e produtos biotecnológicos de alto valor agregado (CARUS; DAMMER, 2018; RONZON et al., 2020). No entanto, apesar do vasto conhecimento acumulado desde o século XIX, autores recentes destacam a necessidade de atualizar e ampliar os estudos sobre o gênero, uma vez que muitas de suas características clássicas permanecem subexploradas em novas abordagens tecnológicas e ambientais (HERRMANN et al., 2024).

3.4 Alfa-amilase

A alfa-amilase (α -1,4-glucano-glucanohidrolase) é uma enzima endo-hidrolase amplamente distribuída em organismos procariontes e eucariontes, com capacidade de romper ligações α -1,4-glicosídicas internas de polissacarídeos como o amido, glicogênio e seus derivados, resultando na liberação de oligossacarídeos e glicose (Figura 1) (YAO et al., 2021).

Figura 1: Mecanismo de ação da alfa-amilase



Fonte: NADAROGLU; POLAT(2022).

O amido, principal substrato desta enzima, é composto pelos polímeros amilose e amilopectina, que contêm cadeias lineares e ramificadas unidas por ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas, respectivamente (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

A alfa-amilase representa um dos grupos mais importantes entre as amilases, sendo responsável pela hidrólise inicial dessas cadeias e desempenhando papel fundamental em processos fermentativos e industriais (ALVES, 2018; ALMEIDA, 2021). Estima-se que as amilases correspondam a cerca de 30–33% do mercado mundial de enzimas, devido à sua ampla aplicação em setores como alimentos, bebidas, detergentes, têxteis, papel e fármacos, além de processos de bioconversão e produção de biocombustíveis (MUSHTAQ et al., 2024).

A produção microbiana de α -amilase tem se mostrado particularmente vantajosa em função da facilidade de manipulação genética, alta estabilidade, baixo custo de cultivo e elevada produtividade em larga escala (GUPTA et al., 2003; LI et al., 2022). Espécies do gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*, destacam-se pela capacidade de secretar α -amilases termoestáveis, frequentemente exploradas em processos industriais que demandam resistência a variações de pH e temperatura (ALVES, 2018; SOUZA; MAGALHÃES, 2010). *Bacillus subtilis*, em especial, é amplamente reconhecida como uma plataforma segura e eficiente para expressão de enzimas industriais, devido à sua natureza GRAS (geralmente reconhecido como seguro), alta capacidade de secreção proteica e processos fermentativos bem estabelecidos (LI et al., 2022; YAO et al., 2023).

Avanços recentes em engenharia de promotores e elementos regulatórios de expressão têm permitido otimizar a síntese extracelular dessa enzima, aumentando significativamente sua atividade e rendimento em condições industriais (YAO et al., 2023). Além disso, a α -amilase pode atuar em consórcio com outras hidrolases, como celulasas, proteases e lipases, integrando coquetéis enzimáticos de aplicação em detergentes biodegradáveis, que aliam alta eficiência de limpeza a menor impacto ambiental (INAN BEKTAS et al., 2023).

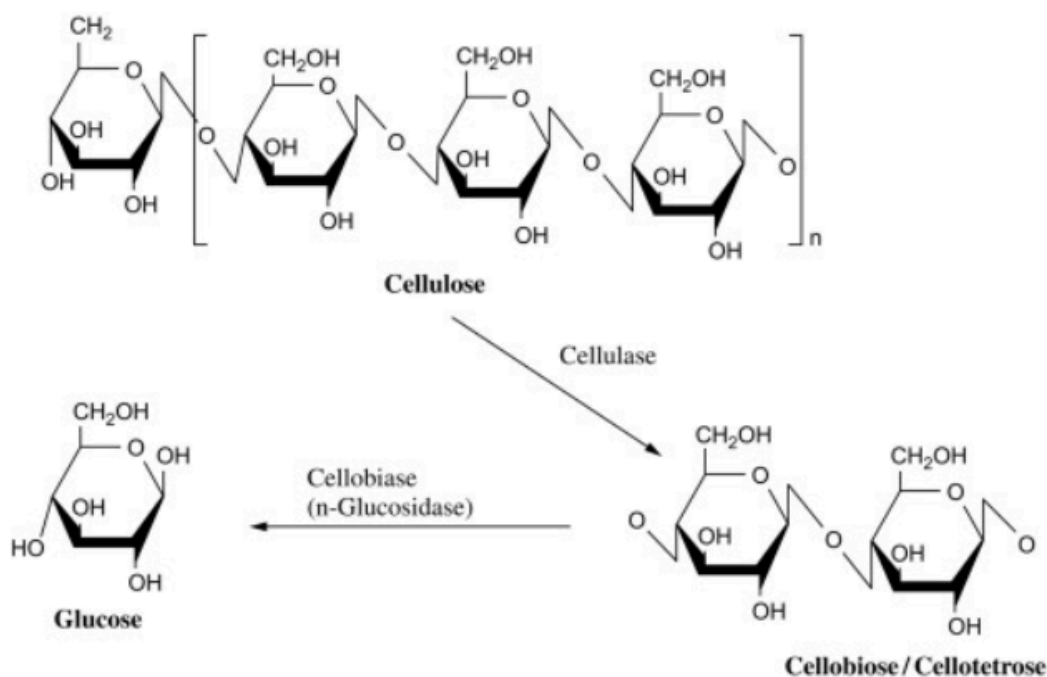
Assim, a alfa-amilase se destaca não apenas por seu papel essencial na degradação do amido, mas também como um biocatalisador versátil de grande

relevância biotecnológica, cuja produção por bactérias do gênero *Bacillus* têm sido intensamente estudada e aprimorada para atender às crescentes demandas de processos sustentáveis e economicamente viáveis nas indústrias moderna e emergente (MUSHTAQ et al., 2024; YAO et al., 2023).

3.5 Celulase

A celulase é uma enzima de grande relevância biotecnológica, responsável pela hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas da celulose (Figura 2), principal componente estrutural das paredes celulares vegetais e um dos polissacarídeos mais abundantes da biosfera (TULI; ARINDAM KUILA, 2021).

Figura 2: Mecanismo de ação da celulase



Fonte: NADAROGLU; POLAT(2022).

A degradação enzimática da celulose resulta na liberação de açúcares redutores, principalmente glicose, que podem ser aproveitados como substratos fermentáveis na produção de bioetanol e outros bioprodutos (YE et al., 2017).

O complexo celulolítico é formado por três classes principais de enzimas que atuam de forma sinérgica: as endoglucanases, que clivam aleatoriamente as

ligações internas da cadeia de celulose; as exoglucanases, que removem unidades de celobiose das extremidades; e as β -glicosidases, que convertem a celobiose em glicose (ALVES, 2018). Essa ação conjunta confere alta eficiência à degradação de biomassa lignocelulósica, etapa essencial para a bioconversão de materiais vegetais em produtos de valor agregado.

Nos últimos anos, as celulases bacterianas vêm recebendo maior destaque, devido à facilidade de cultivo microbiano, à rápida taxa de crescimento das células produtoras e à estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012). Em particular, espécies de *Bacillus* têm se mostrado promissoras fontes enzimáticas por apresentarem alta atividade catalítica e por tolerarem condições extremas de cultivo, tornando-se modelos para o aproveitamento de resíduos agroindustriais (MUSHTAQ et al., 2024).

As celulases têm ampla aplicação industrial, sendo utilizadas em processos de clarificação de sucos e vinhos, na maceração de frutas e vegetais, no acabamento de tecidos de algodão e jeans, na fabricação e branqueamento de papel e celulose, e em formulações detergentes (CHEN et al., 2012; DING et al., 2008). No setor energético, destacam-se pela contribuição na hidrólise de biomassa para produção de bioetanol e outros biocombustíveis, representando uma alternativa sustentável aos métodos químicos tradicionais, que são mais poluentes e economicamente dispendiosos (ASLAM; HUSSAIN; QAZI, 2017). Além disso, as celulases microbianas são empregadas na indústria farmacêutica, na alimentação animal e na obtenção de compostos de alto valor agregado, como solventes e aditivos alimentares (ELSABABTY et al., 2022).

A exploração de microrganismos de ambientes naturais e extremos tem possibilitado o isolamento de cepas produtoras de celulases termoestáveis, com propriedades desejáveis para uso industrial (KHADKA et al., 2022). Microrganismos termofílicos, como *Bacillus amyloliquefaciens* e *Geobacillus* sp., têm sido amplamente estudados por apresentarem enzimas resistentes a elevadas temperaturas e com elevada atividade catalítica, características que aumentam a solubilidade dos substratos, reduzem o risco de contaminação e aceleram as reações bioquímicas (FOUDA et al., 2023; LISZKA et al., 2012). O isolamento de

bactérias com potencial celulolítico a partir de ecossistemas variados, incluindo solos agrícolas, resíduos industriais e até o trato intestinal de animais, amplia as perspectivas para a descoberta de novas variantes enzimáticas de interesse biotecnológico (YANG et al., 2014; WANG et al., 2024).

A produção de celulase por via microbiana depende de múltiplos fatores ambientais e nutricionais. Estudos demonstram que o tamanho do inóculo, o pH, a temperatura, o tempo de incubação, a aeração e a presença de indutores influenciam diretamente na atividade enzimática (WAHEEB et al., 2024). A otimização desses parâmetros em condições de fermentação sólida ou submersa é essencial para maximizar o rendimento e a estabilidade da enzima (ISLAM et al., 2019). Estratégias modernas, como a metodologia de superfície de resposta, têm sido empregadas para determinar as condições ideais de produção, especialmente em cepas de *Bacillus cereus* e *Bacillus brevis*, resultando em elevadas taxas de conversão de substratos lignocelulósicos (WANG et al., 2024). Paralelamente, avanços em biotecnologia molecular, como clonagem gênica e evolução dirigida, vêm sendo aplicados para aprimorar a eficiência catalítica e a termoestabilidade das celulases, otimizando sua aplicação em escalas industriais (EL-KHAMISI et al., 2024).

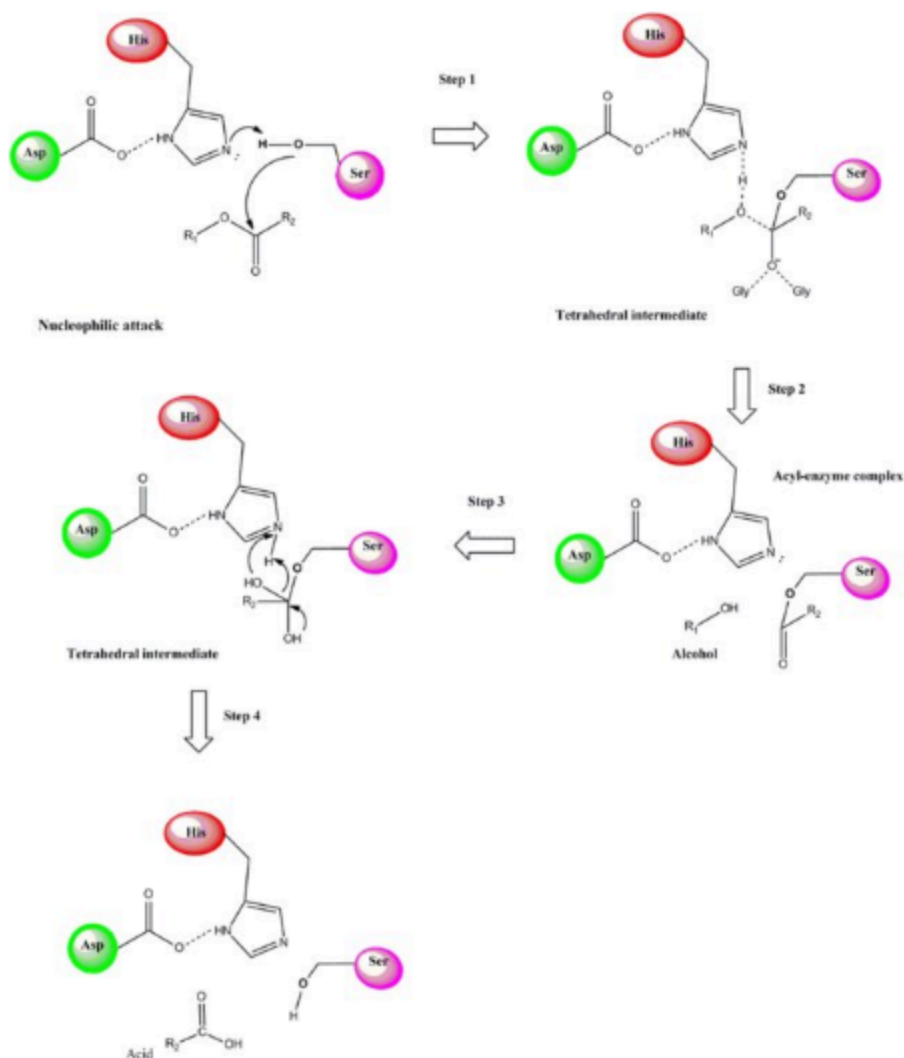
O crescente interesse nas celulases microbianas reflete o potencial dessas enzimas como ferramenta estratégica na transição para uma economia circular e de baixo carbono. A capacidade de converter resíduos lignocelulósicos em produtos energéticos e químicos renováveis, aliada à diversidade metabólica de bactérias e fungos celulolíticos, evidencia a importância de ampliar pesquisas voltadas ao isolamento, otimização e caracterização dessas enzimas, fortalecendo sua aplicabilidade em processos industriais sustentáveis (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; KUMAR et al., 2021; BUSSLER et al., 2021).

3.6 Esterase

As esterases são enzimas lipolíticas pertencentes à classe das hidrolases, responsáveis por catalisar a clivagem e formação de ligações ésteres, convertendo

ésteres em seus respectivos ácidos carboxílicos e álcoois, conforme Figura 3 (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

Figura 3: Mecanismo de ação da esterase



Fonte: BARZKAR et al. (2021).

Essas enzimas apresentam ampla especificidade de substrato, não requerem cofatores e mantêm estabilidade em solventes orgânicos, o que as torna catalisadores promissores em processos biotecnológicos e industriais (BARZKAR et al., 2021). O termo esterases designa carboxilesterases que hidrolisam ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas, geralmente com menos de dez átomos de carbono, exibindo preferência por substratos solúveis em água (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Originalmente, as enzimas lipolíticas bacterianas foram agrupadas em oito famílias distintas com base na similaridade de sequência e em

características funcionais, conforme proposto por Arpigny e Jaeger (1999). Desde então, novas famílias vêm sendo identificadas, elevando o total para quinze, o que reflete a crescente diversidade de lipases e esterases descobertas em ambientes metagenômicos e em isolamento puro (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Estruturalmente, essas enzimas pertencem à superfamília das serina-hidrolases (KUMAR et al., 2021; SHIN et al., 2021), além de atuarem na catálise de hidrólise, esterificação e transesterificação, as esterases desempenham papéis regulatórios importantes em vias metabólicas e processos de detoxificação (YIN et al., 2021).

Graças à sua versatilidade, essas enzimas têm sido aplicadas em múltiplos setores, incluindo síntese de biopolímeros e biodiesel, além das indústrias alimentícia, têxtil, de detergentes e papel, bem como em processos de biorremediação (BARZKAR et al., 2021; BHARDWAJ; SAUN; GUPTA, 2017). No campo ambiental, esterases participam ativamente da degradação de compostos xenobióticos, sendo consideradas uma alternativa ambientalmente segura para remoção de compostos recalcitrantes (BHATT et al., 2020; BHATT et al., 2021). A capacidade dessas enzimas de atuar em meios aquosos ou restritos em água, sem necessidade de íons metálicos, reforça seu potencial em processos sustentáveis de biocatálise (DUARTE et al., 2016).

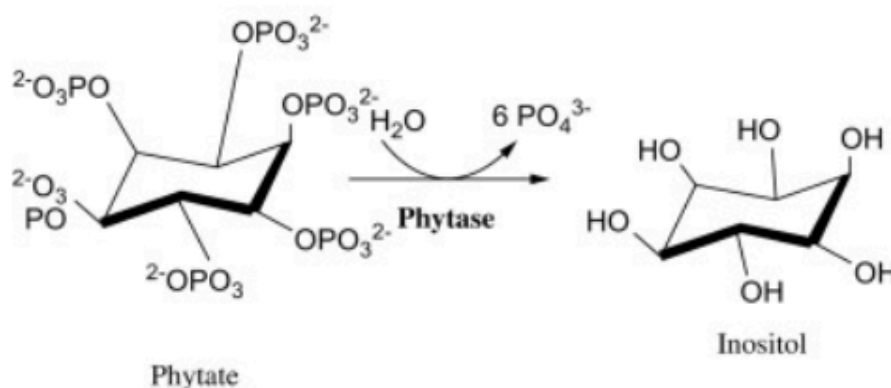
Nos últimos anos, a busca por novas fontes microbianas produtoras de esterases tem se intensificado, visando sua aplicação em processos industriais sob condições extremas, com foco na redução de custos e na melhoria da estabilidade do biocatalisador (MAESTER et al., 2020; ADIGÜZEL, 2020; BHARDWAJ et al., 2021). Tais características tornam as esterases ferramentas versáteis para uso em biotecnologia, farmacologia e ciências ambientais, com potencial crescente em bioprocessos sustentáveis e de alto valor agregado.

3.7 Fitase

A fitase é uma enzima essencial na degradação do ácido fítico (ou fitato), principal forma de fósforo orgânico presente em plantas e solos. Este composto, embora abundantemente encontrado em alimentos vegetais, é pouco biodisponível

para animais monogástricos, como humanos e aves, devido à sua capacidade de quelar minerais essenciais, prejudicando a absorção de nutrientes (JAIN et al., 2016). A hidrólise do fitato pela fitase resulta na liberação de fosfato inorgânico, um nutriente bioativo facilmente absorvido, o que aumenta a eficiência do aproveitamento do fósforo na alimentação animal, além de mitigar os impactos ambientais causados pela excreção de fitato não digerido (BALABAN et al., 2016).

Figura 4: Mecanismo de ação da fitase



Fonte: NADAROGLU; POLAT(2022).

Em particular, a aplicação de fitases em rações para monogástricos representa uma solução biotecnológica eficiente para resolver tanto problemas nutricionais quanto ambientais, visto que diminui a necessidade de fontes externas de fósforo, um recurso cada vez mais escasso (ZHAO et al., 2021). As fitases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, plantas e microrganismos, com destaque para as espécies do gênero *Bacillus*, que têm se mostrado eficientes na secreção de fitase e no processo de mineralização do fósforo no solo (TARIQ et al., 2023). Essas bactérias, além de desempenharem papel importante no ciclo do fósforo no ambiente, têm sido amplamente utilizadas na agricultura e na biotecnologia devido às suas propriedades de solubilização de fósforo e produção de outras substâncias benéficas, como indol-3-acético e ácidos graxos (SAXENA et al., 2020).

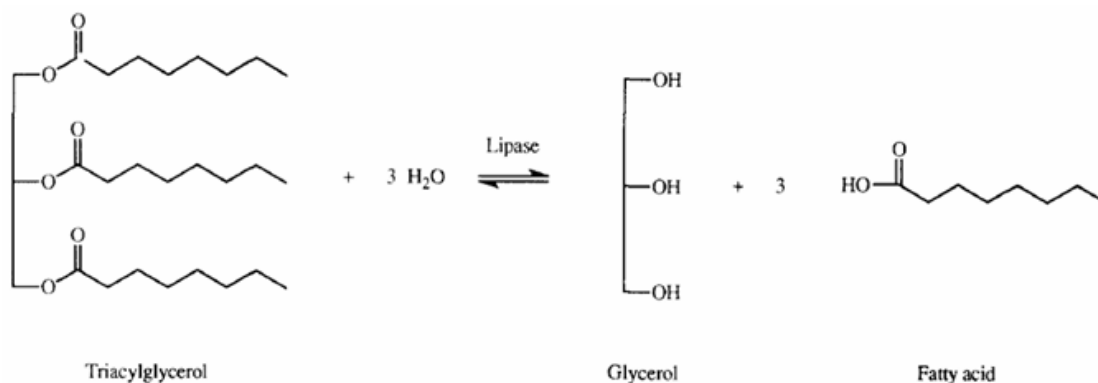
As fitases podem ser classificadas em diferentes tipos: as fitases de ácido histidina, fitases de cisteína e fitases de β -propeller, com variações em sua estrutura catalítica e na capacidade de atuar em diferentes faixas de pH, desde condições

ácidas a neutras e alcalinas (CHEN et al., 2016). Além disso, o processo de hidrólise do fitato pela fitase também resulta na produção de inositol, um composto de grande interesse nas indústrias de alimentos, ração e medicina, devido às suas propriedades biológicas que incluem atividades análogas às vitaminas B1 e H, sendo utilizado no tratamento de doenças crônicas, como as cardiovasculares, hepáticas, além de distúrbios metabólicos, como a diabetes e a obesidade (SHI, 2017; YANG et al., 2019). Portanto, a fitase, além de seu papel fundamental na nutrição animal e sustentabilidade ambiental, apresenta um vasto potencial para aplicações biotecnológicas em diversas áreas industriais e terapêuticas.

3.8 Lipase

As lipases são enzimas hidrolíticas pertencentes ao grupo das serina hidrolases, capazes de catalisar a hidrólise de ligações éster-carboxílicas em triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (ALVES, 2018).

Figura 5: Mecanismo de ação da lipase



Fonte: ABDELMONAEM et al. (2010).

Estruturalmente, integram a superfamília lipase–esterase, caracterizada pela presença de uma serina no sítio ativo e por um padrão estrutural altamente conservado entre diferentes organismos (AKOH et al., 2004). Essas enzimas ocorrem amplamente em plantas, animais e microrganismos, mas as de origem bacteriana se destacam pela maior estabilidade e facilidade de manipulação genética, o que favorece sua aplicação em processos industriais (HASAN; SHAH;

HAMEED, 2006; SAHU; MARTIN, 2011). Dentre os microrganismos produtores, as espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são as mais estudadas, especialmente por apresentarem elevada capacidade de secreção extracelular e resistência a variações ambientais (ALVES, 2018; FATIMA et al., 2020).

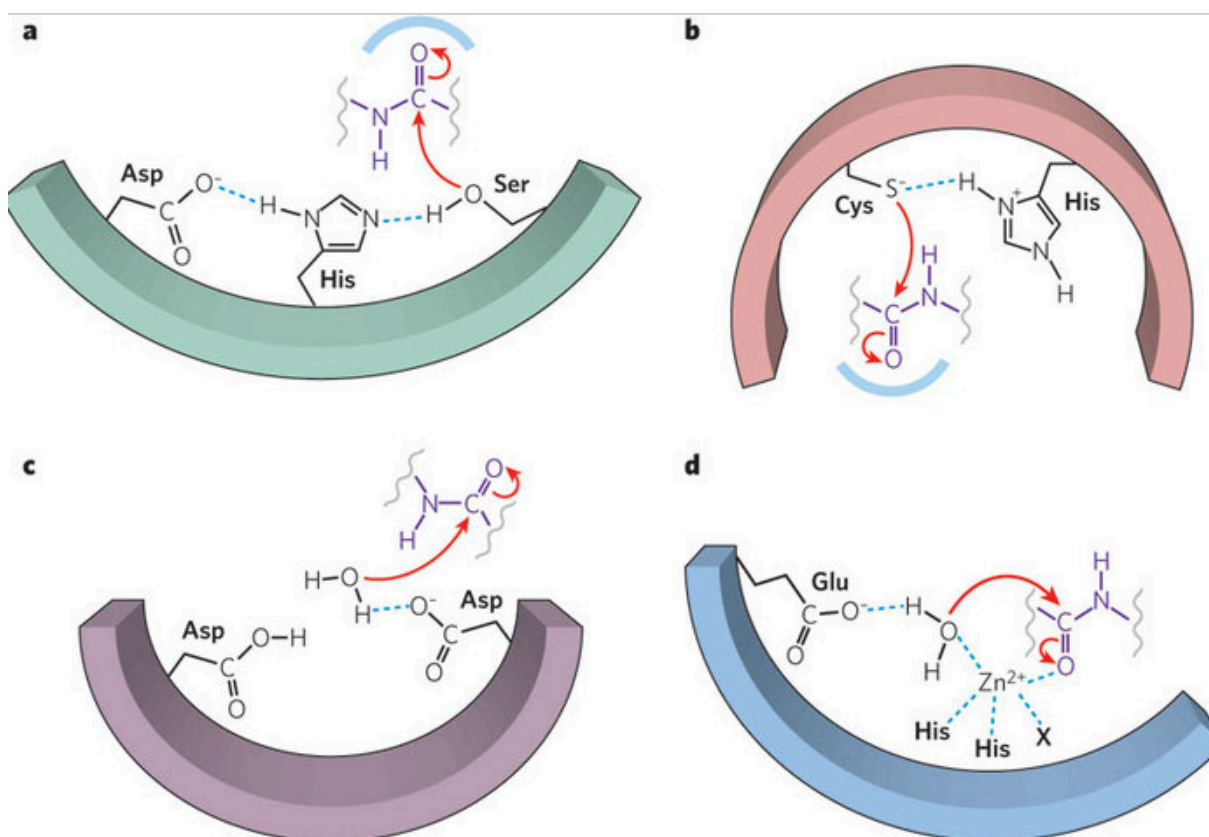
A produção microbiana de lipases pode ser estimulada por diferentes fontes de carbono, como óleos vegetais, resíduos agroindustriais e efluentes de laticínios, que atuam como substratos indutores e contribuem para o reaproveitamento de resíduos orgânicos (GASPARINI et al., 2020). Além da hidrólise de lipídios, as lipases também participam de reações reversas, como esterificação, transesterificação e interesterificação, ampliando sua aplicabilidade em múltiplos setores (MARTINS, 2021). No contexto industrial, essas enzimas são empregadas na formulação de detergentes, na modificação de gorduras e óleos alimentares, na síntese de compostos de interesse farmacêutico, cosmético e de aromas, bem como na produção de biocombustíveis por meio da transesterificação de óleos vegetais (SHARMA et al., 2024; XU et al., 2025).

Do ponto de vista ambiental, as lipases microbianas também exercem papel fundamental na degradação de lipídios em diversos ecossistemas, contribuindo para a ciclagem de nutrientes e a decomposição da matéria orgânica (FATIMA et al., 2020). Sua produção a partir de resíduos e efluentes reforça o potencial sustentável dessas enzimas, alinhando-se à demanda crescente por biocatalisadores renováveis e ambientalmente seguros. Assim, as lipases representam um grupo enzimático de grande importância biotecnológica, cuja versatilidade catalítica e diversidade de aplicações consolidam seu papel estratégico em setores industriais e ambientais contemporâneos (COLLA et al., 2010; MARTINS, 2021).

3.9 Protease

As proteases são enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra de ligações peptídicas em proteínas, liberando peptídeos menores e aminoácidos, o que as torna fundamentais para o metabolismo celular e o ciclo do nitrogênio (SI et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

Figura 6: Mecanismo de ação da protease



Fonte: Scitable (2014).

Proteases solúveis de serina (a); proteases de cisteína (b); proteases aspárticas (c); e metaloproteases (d).

Essas enzimas podem ser classificadas em exopeptidases, que removem resíduos nas extremidades da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que atuam em regiões internas das proteínas (ALVES, 2018). As endopeptidases subdividem-se em quatro grupos principais: serina, cisteína, aspártica e metaloproteases, de acordo com o resíduo catalítico no sítio ativo (ALVES, 2018, apud ALMEIDA, 2021).

Embora sejam encontradas em plantas e animais, os microrganismos são amplamente preferidos industrialmente devido à facilidade de cultivo, à elevada produtividade e à secreção extracelular de enzimas (ALMEIDA, 2021). Dentro deste grupo, o gênero *Bacillus* se destaca como produtor de proteases alcalinas de interesse industrial, cuja produção pode ser aumentada por técnicas de otimização e engenharia genética (JIANG et al., 2022; REDDY et al., 2022).

As aplicações biotecnológicas das proteases são vastas, estas enzimas encontram ampla atuação na indústria de alimentos, contribuindo para a limpeza de

cervejas, na formação de queijos, na textura de carnes e o preparo de massas (SHUKLA; GHAROTE; MUCHAHARY, 2025). Na indústria de detergentes, atuam como aditivos para a remoção de manchas proteicas, oferecendo alternativa biodegradável e sustentável em substituição a produtos químicos agressivos (GÜRKÖK, 2019). Também são aplicadas na indústria têxtil, no curtimento de couro, no tratamento de efluentes e até na recuperação de prata a partir de filmes radiográficos (AL-ABDALALL; AL-KHALDI, 2016, apud RAZZAQ et al., 2019). Além disso, apresentam aplicações no setor farmacêutico, em formulações terapêuticas (RAZZAQ et al., 2019), e no biocontrole de fitopatógenos, como no caso de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium oxysporum* (GULERIA et al., 2016).

Assim, as proteases consolidam-se não apenas como enzimas essenciais em processos biológicos, mas também como ferramentas estratégicas da biotecnologia moderna, unindo eficiência produtiva, sustentabilidade e inovação (SHARMA et al., 2017; RAZZAQ et al., 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação dos isolados de *Bacillus* spp.

Os microrganismos utilizados neste estudo foram isolados entre janeiro e março de 2024, durante a execução do projeto intitulado “Prospecção e caracterização de microrganismos com potencial biotecnológico com impacto na Saúde Única”. Os microrganismos foram isolados a partir de dez amostras de cama de aviário fornecidas pela empresa BIOTECNAL Ltda, localizada em Toledo/PR. As amostras foram coletadas em diferentes produtores do Paraná, seguindo protocolo padronizado.

As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos, transportadas sob refrigeração e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na empresa. Posteriormente, foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (Florianópolis/SC), onde ficaram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservação. O isolamento inicial das amostras foi realizado por suspensão em solução salina estéril, seguido de agitação, sedimentação, tratamento térmico em termobloco a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 minutos e diluições seriadas antes de serem semeadas em ágar Tryptic

Soy (TSA) e ágar Tryptic Soy alcalinizado, com pH de 9,5 aproximadamente. Após incubação, as colônias com morfologias distintas foram selecionadas, repicadas e analisadas por coloração de Gram. Apenas as colônias de bacilos Gram-positivos receberam códigos e foram preservadas em meio apropriado a -80°C .

Para isolar populações sub-representadas, foi adotado um protocolo adaptado com suspensão das amostras, incubação controlada e tratamento térmico, seguidos de cultivo em caldo germinativo. Colônias com diferentes morfologias foram selecionadas, repicadas e analisadas por coloração de Gram. Isolados de bacilos Gram-positivos receberam códigos e foram preservados em meio apropriado a -80°C .

A identificação dos isolados foi realizada com o equipamento Biotyper® Sirius One System (Bruker), utilizando espectrometria de massas por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight), conforme as recomendações do fabricante. As espécies bacterianas identificadas e o número de isolados incluídos neste estudo estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Identificação dos isolados

Espécie bacteriana	Número de isolados (n)
<i>Bacillus subtilis</i>	23
<i>Bacillus licheniformis</i>	13
<i>Bacillus velezensis</i>	11
<i>Bacillus mojavensis</i>	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3
<i>Bacillus pumilus</i>	3
<i>Bacillus sonorensis</i>	2
<i>Bacillus atrophaeus</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1
Total	61

4.2 Preparo dos isolados para os testes enzimáticos

Todos os isolados de *Bacillus* spp. foram reativados em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37°C overnight. Depois, foram transferidos para 5 mL do meio líquido Luria-Bertani (LB) onde foram incubados a 39°C por 24 h sob agitação orbital de 250 rpm. Após a incubação, o volume de 1,5 mL de cada cultivo foi transferido para tubo de 2 mL, centrifugado a 7000 g por 10 minutos. O próximo passo foi descartar o sobrenadante, adicionar novamente 1,5 mL da suspensão e repetir a etapa de centrifugação, a fim de aumentar a quantidade de células bacterianas. Após, foram realizados movimentos para cima e para baixo com a ponteira a fim de homogeneizar os pellets com salina estéril, e em seguida, as culturas de *Bacillus* spp. foram suspensas em salina estéril até atingirem a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, com o auxílio de uma alça, os isolados foram estriados nos meios enzima-específicos e incubados a 39°C por 24 horas para os testes de alfa-amilase, esterase, celulase e protease, e 48 horas para os testes de fitase e lipase. Todos os testes foram realizados em duplicata biológica, ou seja, com lotes de meios de cultura e crescimento dos isolados de *Bacillus* spp. realizados em períodos distintos.

4.3 Composição e preparo de meios de cultura específicos para os testes de atividade enzimática extracelular

4.3.1 Teste para atividade de alfa-amilase

O ensaio selecionado para a verificação da atividade de alfa-amilase foi descrito por MENDU et al. (2005). Inicialmente, foi preparado um meio de cultura contendo os seguintes componentes (g/L): 10 g de amido de milho, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,15 g de cloreto de cálcio anidro, 1 g de fosfato de amônio dibásico e 15 g de ágar. Após crescimento por 24 h, para a revelação dos resultados as placas foram cobertas com solução de Lugol e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente, após isso a solução foi removida e a leitura foi realizada.

4.3.2 Teste para atividade de celulase

O ensaio selecionado para confirmar a atividade da enzima extracelular celulase foi descrito por JOSÉ; SÂMIA MARIA TAUKE-TORNISIELO (2004); SARSAIYA et al. (2018) e KETTERINE CARVALHO et al. (2021). Para a realização do teste, foi preparado um meio contendo os seguintes componentes (g/L): 6,7 g de peptona; 10 g de carboximetilcelulose (CMC) e 20 g de ágar. Após crescimento *overnight*, para a revelação do teste, as placas foram cobertas com o corante vermelho congo (0,1%) e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente, após isso a solução foi removida e a leitura foi realizada.

4.3.3 Teste para atividade de esterase

O ensaio selecionado para a verificação da atividade de esterase foi descrito por MACHADO et al. (2022). Inicialmente, foi preparado um meio de cultura contendo os seguintes componentes (por litro): 10 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio, 3 g de cloreto de cálcio anidro, 20 g de ágar e 9,43mL de Tween 80.

4.3.4 Teste para atividade de fitase

O ensaio selecionado para a verificação da atividade de fitase foi adaptado de DEMIRKAN; BAYGIN; USTA (2014). Inicialmente foi realizado o ajuste de pH, da solução contendo ácido fítico, onde foram colocados 5,8 mL de ácido fítico em 800 mL de água, então o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 10 M. Então foram adicionados os seguintes componentes (g/L): 20 g de glicose, 1,5 g de cloreto de cálcio, 5 g de nitrato de amônio, 0,5 g de cloreto de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,0055 g de sulfato ferroso, 0,006 g de sulfato de manganês monohidratado e 15 g de ágar e o volume final do meio foi ajustado para 1L.

4.3.5 Teste para atividade de lipase

O ensaio selecionado para a verificação da atividade de lipase foi descrito por MACHADO et al. (2022). Inicialmente, foi preparado um meio de cultura contendo os seguintes componentes (g/L): 8 g de caldo nutriente, 4 g de cloreto de sódio e 20 g de ágar. Após autoclavado, porém antes de o meio ser vertido, foi filtrado em membrana de 0,22µm e adicionado 31,25 mL de azeite de oliva e uma solução de 0,1 g de Rodamina B ressuspensa em 10mL de álcool absoluto. O meio foi agitado vigorosamente até ficar homogêneo.

4.3.6 Teste para atividade de protease

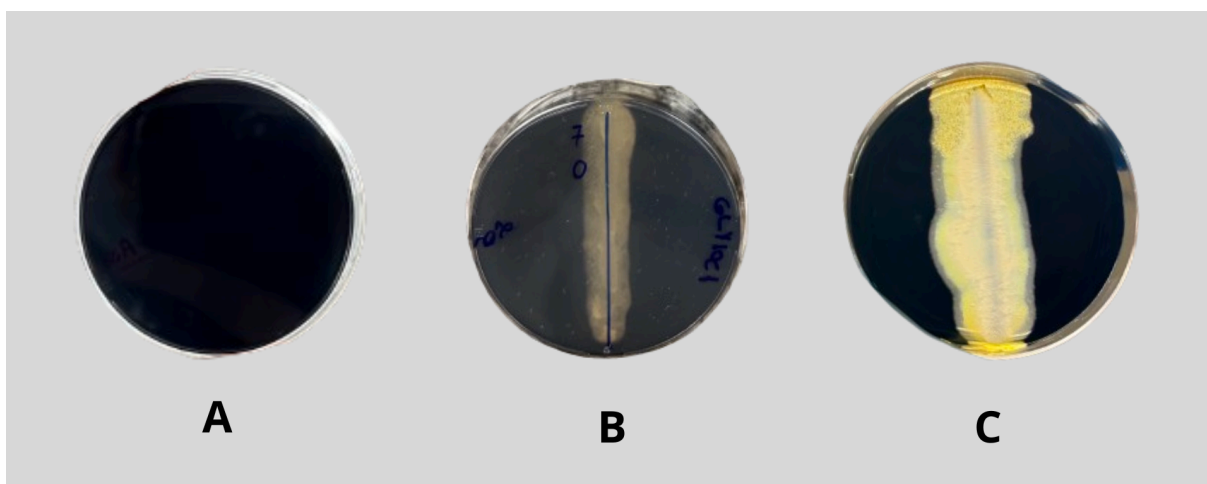
O ensaio selecionado para confirmar a atividade da enzima extracelular protease foi descrito por GOMAA (2013). Para a realização do teste, foi preparado um meio contendo os seguintes componentes (g/L): 1 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,1 g de cloreto de cálcio anidro; 0,5 g de fosfato de potássio dibásico; 0,2 g de sulfato de magnésio heptahidratado; 10 g de leite desnatado em pó @Molico; 10 g de caseína e 20 g de ágar. Após crescimento *overnight*, para a revelação do teste, as placas foram cobertas com o corante Coomassie Blue G-250 (0,1 %) e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente, após isso a solução foi removida e a leitura foi realizada.

4.4 Leitura e interpretação dos testes de atividade de enzimas extracelulares

A leitura das placas de testes enzimáticos foi feita com o auxílio de uma régua. Foram feitas 2 medidas: do crescimento da colônia e da zona de degradação, nos casos em que a atividade enzimática ultrapassou o crescimento bacteriano. Para os testes de alfa-amilase, celulase, esterase, fitase e protease, foram obtidas três interpretações: (i) observação apenas do crescimento bacteriano superficial, sem apresentar degradação, ou seja, sem atividade de enzimas extracelulares no meio enzima-específico; (ii) observação da degradação apenas embaixo do crescimento da colônia no meio enzima-específico e (iii) observação de zona de degradação além da área de crescimento da colônia, demonstrando uma atividade enzimática de maior intensidade no meio enzima-específico.

Na leitura do teste de esterase observou-se o aparecimento de uma zona fosca (Figura 8), diferente dos demais testes que apresentaram o aparecimento de uma zona clara, demonstrando a atividade da enzima no meio (Figuras 7, 9 e 10).

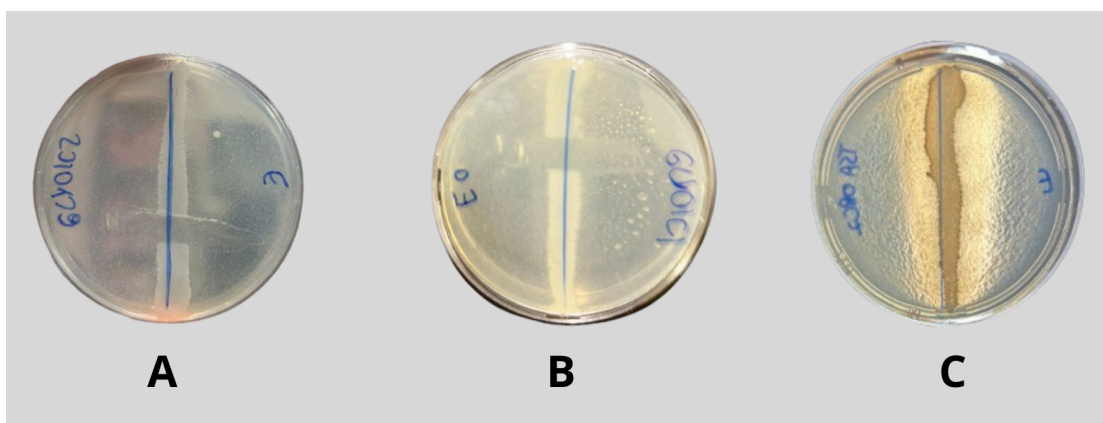
Figura 7: Teste enzimático de alfa-amilase



Fonte: a autora (2025).

Interpretação do teste de atividade para alfa-amilase. A: meio para o teste representando um isolado sem atividade enzimática. B: meio para o teste representando baixa atividade para alfa-amilase. C: meio para o teste representando atividade moderada para alfa-amilase.

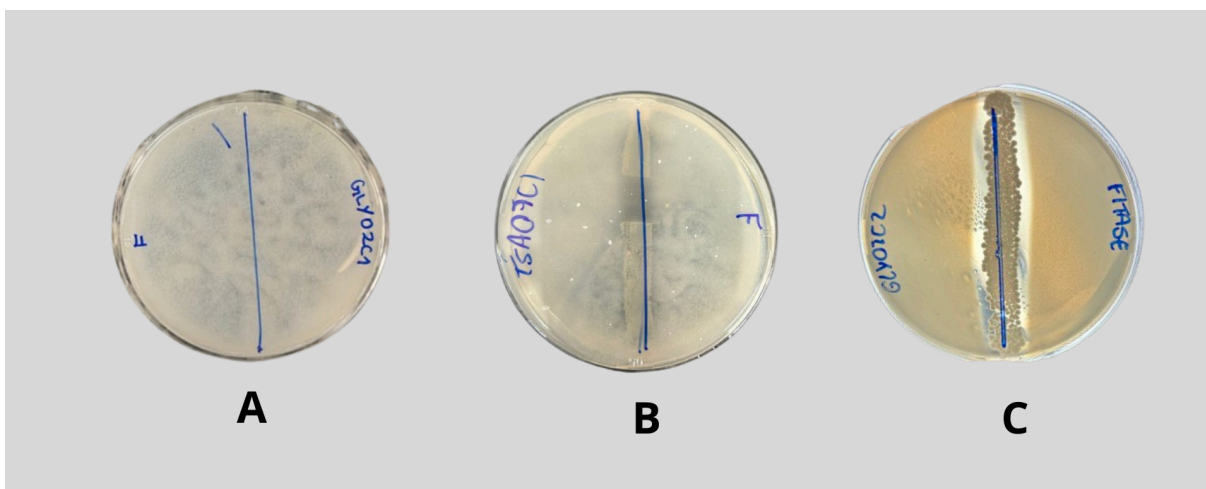
Figura 8: Teste enzimático de esterase



Fonte: a autora (2025).

Interpretação do teste de atividade para esterase. A: meio para o teste representando um isolado sem atividade enzimática. B: meio para o teste representando baixa atividade para esterase. C: meio para o teste representando alta atividade moderada para esterase.

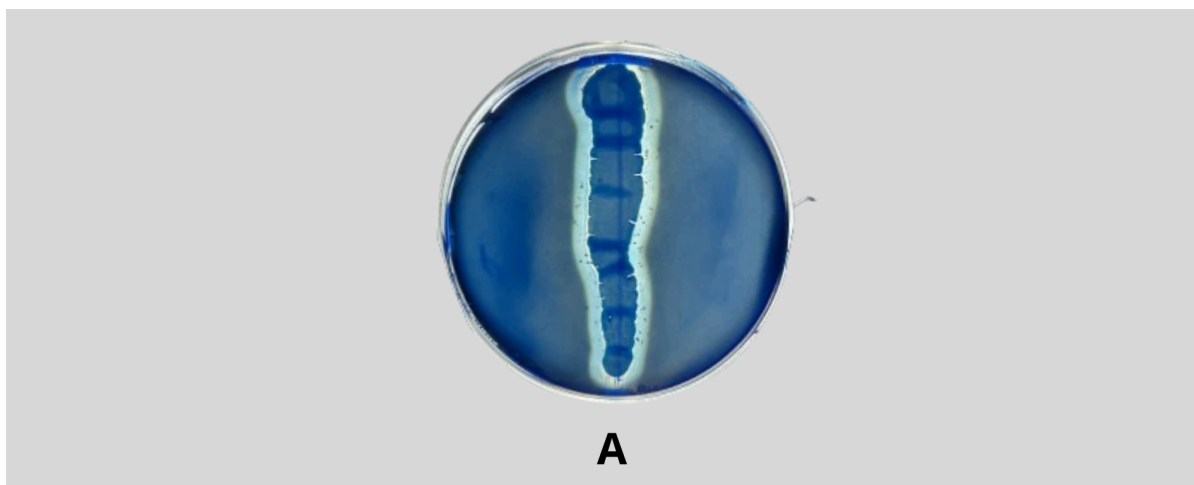
Figura 9: Teste enzimático de fitase



Fonte: a autora (2025).

Interpretação do teste de atividade para fitase. A: meio para o teste representando um isolado sem atividade enzimática. B: meio para o teste representando baixa atividade para fitase. C: meio para o teste representando atividade moderada para fitase.

Figura 10: Teste enzimático de protease



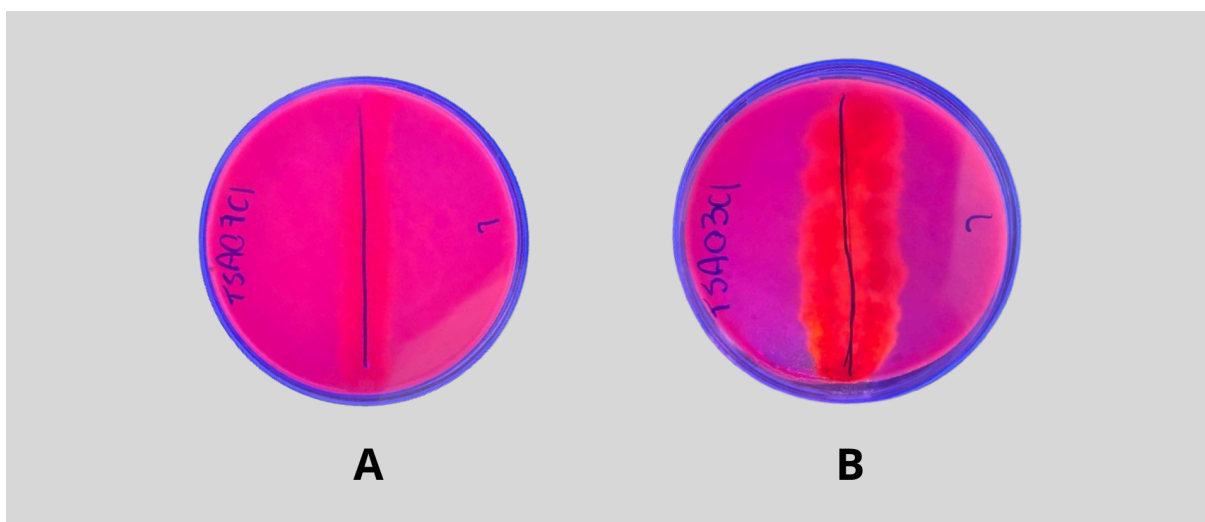
Fonte: a autora (2025).

Interpretação do teste de atividade para protease. A: meio enzima-específico com alta atividade enzimática. Não foram obtidos isolados sem atividade.

Para o teste de lipase, a interpretação da atividade enzimática dos isolados foi feita por meio da presença da cor laranja fluorescente, após as placas serem submetidas à luz UV. Dessa forma, foram obtidas duas interpretações: (i) o meio enzima-específico sem a presença da cor laranja fluorescente (sem atividade de

enzimas extracelulares) e (ii) o meio com a presença de laranja fluorescente, demonstrando atividade enzimática (Figura 11).

Figura 11: Teste enzimático de lipase



Fonte: a autora (2025).

Interpretação do teste de atividade para lipase. A: meio para o teste representando um isolado sem atividade enzimática. B: meio para o teste representando baixa atividade para lipase.

4.5 Cálculo de índice enzimático

Utilizando os registros das medições das zonas de degradação, foi aplicada a relação do índice enzimático (I.E) de cada isolado, utilizando a seguinte fórmula (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975):

$$\text{I.E} = \frac{\text{Diâmetro da zona de degradação}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

A partir da média e mediana dos índices enzimáticos de todos os isolados em duplicata, foram estabelecidos três intervalos que correspondem à intensidade da

atividade enzimática encontrada. Atividade baixa: I.E entre 1 e 1,3; atividade moderada: I.E entre 1,31 e 1,6; e atividade alta: I.E maior que 1,61.

4.6 Análise estatística

O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (ANOVA) do tipo bifatorial, considerando o índice enzimático como variável dependente e espécie bacteriana e enzima como variáveis independentes. O modelo adotado incluiu também o termo de interação entre esses dois fatores, permitindo avaliar não apenas os efeitos principais de cada variável, mas também se o efeito de determinado tipo de enzima depende da espécie bacteriana. A análise foi conduzida utilizando o software RStudio, versão 2023.03.1, build 446 (POSIT TEAM, 2025).

A ANOVA tem como objetivo identificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos comparados. Nesse caso, ela é útil para verificar se o comportamento enzimático varia em função da espécie bacteriana, do tipo de enzima, ou da combinação específica entre ambos. A inclusão do termo de interação é essencial para detectar possíveis efeitos sinérgicos ou moduladores, ou seja, situações em que uma enzima pode apresentar respostas diferentes dependendo da espécie que a produz ou sobre a qual atua.

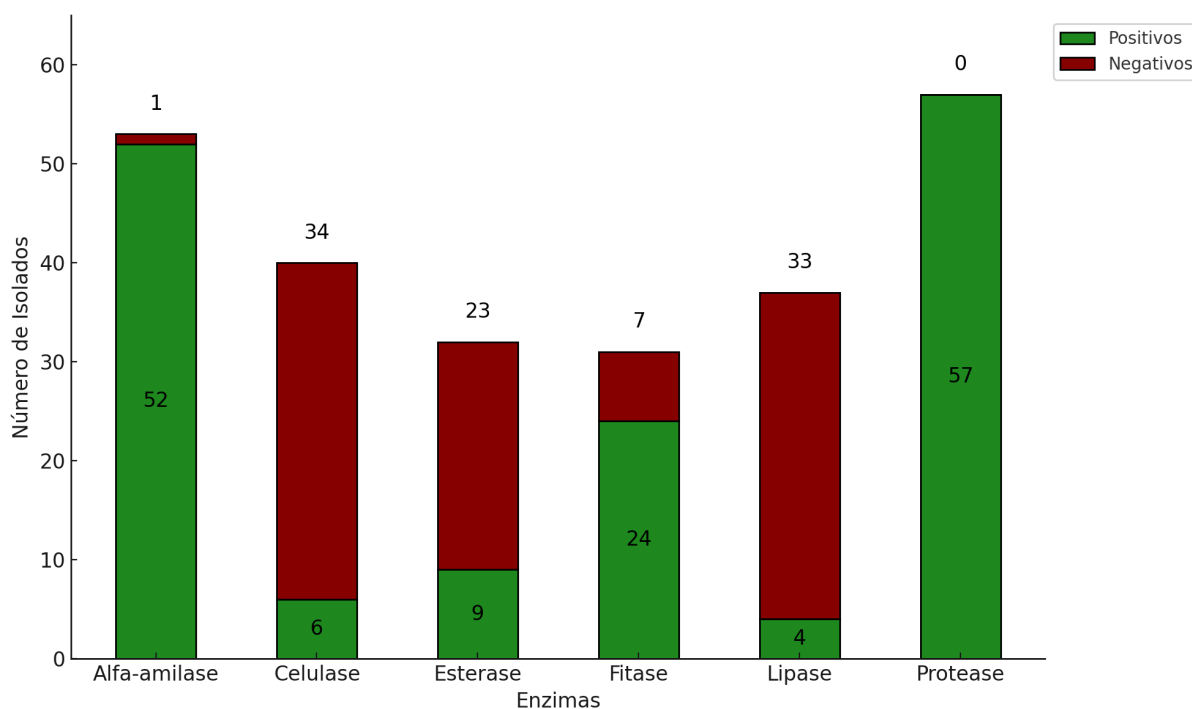
A decomposição da variabilidade total observada no índice enzimático foi realizada em quatro componentes: variação atribuída às espécies bacterianas, variação atribuída às enzimas, variação decorrente da interação entre esses dois fatores e variação residual associada aos erros experimentais. O valor do erro padrão residual obtido indica a magnitude da variação não explicada pelo modelo, funcionando como uma medida da precisão do ajuste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 61 isolados do gênero *Bacillus* apresentaram resultado positivo para pelo menos um teste de atividade de enzimas extracelulares. As enzimas protease, alfa-amilase e fitase apresentaram maior relação entre o total de isolados testados e isolados positivos, com destaque para protease que não obteve isolados negativos

em duplicata. Já os testes enzimáticos para celulase, esterase e lipase inverteram esta relação, com maior número de isolados negativos dentre o total testado (Figura 12).

Figura 12: Distribuição de isolados positivos e negativos para os testes enzimáticos



Legenda: isolados com replicatas inconsistentes não foram contabilizados.

A atividade enzimática reflete a adaptabilidade das espécies de *Bacillus* a diferentes condições ambientais, o que pode ser um indicativo de sua capacidade de atuar em diversos processos industriais, como na produção de enzimas para aplicações alimentícias, agrícolas e de biotecnologia (RITZ et al., 2024). Além disso, a diversidade de atividade enzimática observada nos isolados é consistente com estudos anteriores, como o de ALMEIDA (2024) que destacam o potencial biotecnológico de *Bacillus* na produção de enzimas extracelulares.

Entre as enzimas testadas, a protease, alfa-amilase e fitase destacaram-se por apresentarem mais isolados positivos. O fato de todos os isolados testados para protease terem mostrado resultados positivos é consistente com o comportamento observado em outras espécies de *Bacillus*, que frequentemente produzem proteases

com alta atividade. Essa característica pode ser explicada pela abundância genética de proteases nesses microrganismos. *Bacillus* spp. possuem múltiplos genes codificando diferentes classes de proteases. No estudo de HARWOOD e KIKUCHI (2021) em *B. subtilis*, foram identificadas pelo menos oito proteases extracelulares principais: cinco serino-proteases e três metalo-proteases. Além de estudos genômicos em outras cepas de *Bacillus* que identificaram múltiplos genes de serino-proteases, metaloproteases, cisteíno-proteases e aspartil-proteases no mesmo genoma (HARWOOD; KIKUCHI, 2021; RIZWANUDDIN et al., 2023).

A alfa-amilase também foi amplamente produzida pelos isolados testados, refletindo a capacidade de *Bacillus* de atuar em processos de hidrólise de amidos, essenciais para a produção de bioetanol e outros produtos alimentícios (RATHOD et al., 2023; FOOD SAFETY INSTITUTE 2024). Além disso, a atividade amilolítica é amplamente relatada em isolados do gênero *Bacillus*, ADETILOYE et al. (2025), demonstra que espécies de *Bacillus* representam cerca de 60% das enzimas comerciais produzidas, destacando sua dominância na indústria enzimática devido à sua capacidade de sintetizar amilases termoestáveis com atividade ótima em ampla faixa de pH (ADETILOYE et al., 2025).

Em relação à fitase, a atividade foi encontrada em uma parte significativa dos isolados (77,41%). Isso é relevante, pois a produção de fitase por *Bacillus* tem se mostrado promissora em contextos de melhoria da biodisponibilidade de fósforo em rações animais, especialmente em ambientes com deficiência desse nutriente (JAIN et al., 2016).

Por outro lado, os testes enzimáticos para celulase, esterase e lipase apresentaram um número maior de isolados negativos. Celulases bacterianas vêm ganhando destaque pela facilidade e rapidez de cultivo dos microrganismos e pela estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura; entre elas, espécies de *Bacillus* sobressaem por alta atividade catalítica e tolerância a condições extremas, servindo como modelos para aproveitar resíduos agroindustriais (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; MUSHTAQ et al., 2024). No entanto, as condições do meio de cultivo, como o pH, podem afetar significativamente a atividade celulolítica em *Bacillus*. No estudo de MANITA

SHYAULA et al. (2023) foi relatada uma redução acentuada da atividade celulolítica de uma cepa de *B. licheniformis* abaixo e acima do pH ótimo de 6,5, onde demonstrou atividade máxima de celulase, o que pode explicar o baixo número de isolados positivos para esta enzima.

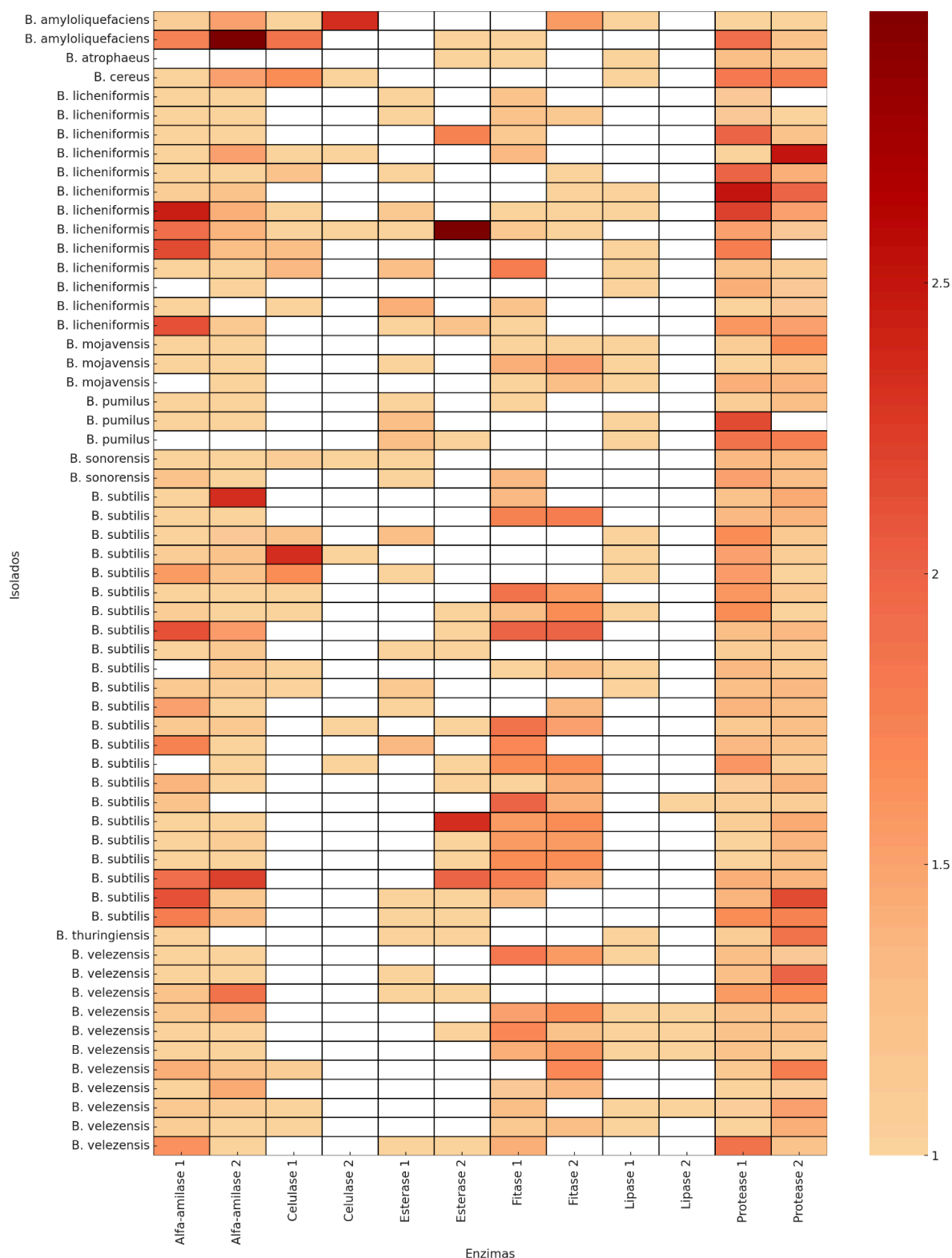
Para a atividade de esterase, o número de isolados positivos também foi mais reduzido, o que pode ser atribuído à especificidade da enzima para substratos particulares, ou à necessidade de condições ambientais específicas para sua produção. BALCI et al. (2023) demonstram que fatores como pH, tempo de adsorção, razão enzima/suporte e temperatura são fundamentais para a produção, imobilização e atividade da esterase derivada de *Bacillus subtilis*, a variação desses fatores alterou significativamente o rendimento e a estabilidade da enzima, o que pode representar o baixo número de isolados positivos.

Por fim, a atividade de lipase foi detectada em menor proporção de isolados (10,81%), corroborando os achados de DEMİRKAN; AYBEY ÇETİNKAYA; ABDU (2021), que sugerem que a atividade lipolítica em *Bacillus* pode ser limitada pela formação de condições específicas de cultivo, melhorias adicionais foram obtidas em condições físicas otimizadas: temperatura de 45°C, pH 7, agitação de 50 rpm, quantidade de inóculo de 7% e idade do inóculo de 24 horas, a otimização resultou em aumento de 51% na produção da enzima em relação ao meio controle (DEMİRKAN; AYBEY ÇETİNKAYA; ABDU, 2021). Estas diferenças nas condições de cultivo podem explicar o número reduzido de isolados positivos para lipase.

Considerando o índice enzimático (I.E, atividade enzimática baixa: de 1 a 1,3, moderada: de 1,31 a 1,6 e alta: maior ou igual a 1,61) foi possível determinar a frequência de isolados para cada intervalo. O teste enzimático para protease apresentou maior frequência de isolados com atividade enzimática, assim como maior concordância entre as replicatas; seguido do teste para alfa-amilase e fitase. Os testes para celulase e lipase demonstram menor atividade enzimática entre os isolados, assim como menor concordância entre as replicatas. Os perfis enzimáticos variaram entre as espécies de *Bacillus* avaliadas. *B. amyloliquefaciens* apresentou perfil especializado, com alta atividade para alfa-amilase. *B. licheniformis* e *B. subtilis* destacaram-se pela versatilidade enzimática, com vários isolados

apresentando atividade para três ou mais enzimas. Entre essas duas espécies, *B. licheniformis* mostrou maior intensidade para protease, enquanto *B. subtilis* apresentou desempenho mais equilibrado entre os diferentes testes. *B. velezensis* demonstrou perfil enzimático amplo e consistente, sendo a espécie com maior número de isolados positivos para lipase, atividade pouco observada nas demais espécies. A atividade de esterase foi observada de forma moderada e pontual entre os isolados testados (Figura 13).

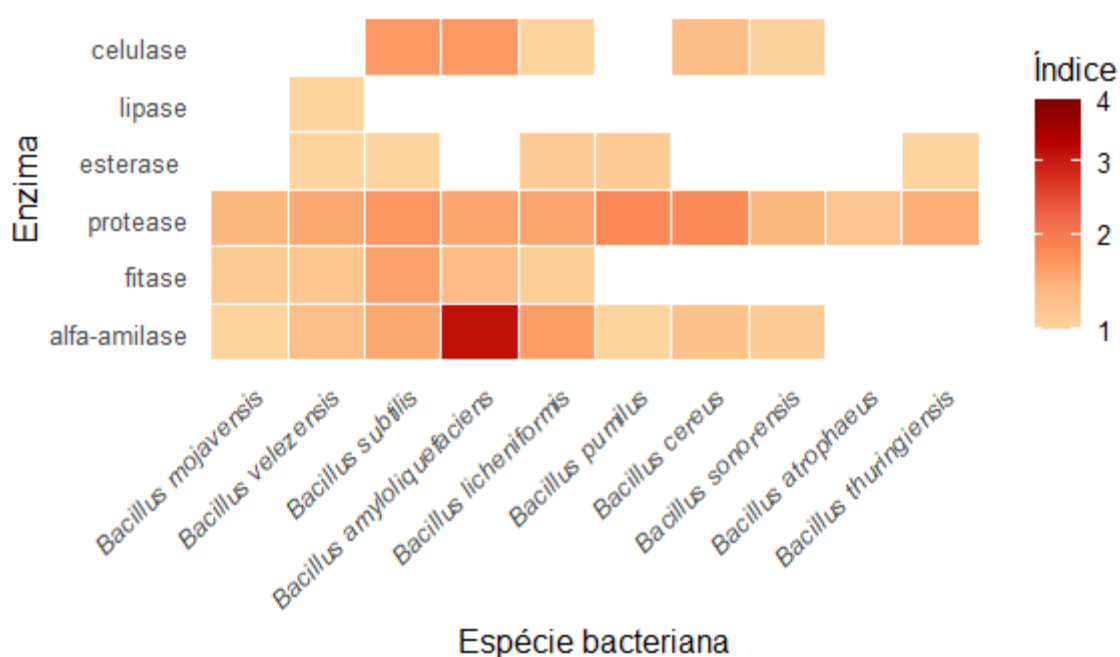
Figura 13: Heatmap do índice enzimático dos isolados testados



Legenda: as replicatas foram representadas pelos números 1 e 2 para cada enzima testada. Células em branco não obtiveram I.E (sem atividade enzimática). A barra lateral representa o índice enzimático.

Os índices enzimáticos também foram agrupados e analisados por espécies. *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. velezensis* apresentaram os melhores desempenhos enzimáticos, apresentando atividade para 5 das 6 enzimas testadas. Todas as espécies apresentaram alguma atividade enzimática para protease, sendo essa uma enzima com ampla distribuição entre os microrganismos testados. Celulase, esterase e lipase aparecem em poucos casos, evidenciando atividade restrita a algumas espécies. O maior índice enzimático observado foi para alfa-amilase na espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, indicando forte produção dessa enzima por essa espécie (Figura 14).

Figura 14: Média de índice enzimático das espécies analisadas



Legenda: células em branco representam espécies sem atividade enzimática.

A análise dos resultados obtidos nos testes enzimáticos para diferentes enzimas em isolados de *Bacillus* revelou perfis distintos de atividade enzimática. A classificação do índice enzimático (I.E.) permitiu categorizar os isolados em três faixas de atividade, e a partir dessa classificação, foi possível observar como as

diferentes espécies e as variáveis influenciam a expressão das enzimas. Os resultados revelaram padrões interessantes, com algumas espécies apresentando um desempenho enzimático mais homogêneo, enquanto outras mostraram uma maior variabilidade.

Os resultados obtidos evidenciaram que a protease foi a enzima com maior frequência de isolados apresentando atividade enzimática, além de demonstrar alta concordância entre replicatas, indicando estabilidade na produção enzimática. Esses achados são consistentes com o estudo de SHAD et al. (2024), que investigaram a produção de protease por *Bacillus subtilis* em cultivo por fermentação em estado sólido, e encontraram não somente uma elevada produção da enzima, mas também uma consistente repetitividade dos resultados. Tal estabilidade e reprodutibilidade na atividade enzimática são essenciais para aplicações industriais, reforçando o potencial biotecnológico dos isolados usados neste trabalho. Além disso, a identificação de *Bacillus licheniformis* como a espécie com maior intensidade na produção de protease corrobora com estudos recentes, como o de ABDELLA e AHMED (2025), que destaca *B. licheniformis* como uma fonte proeminente de proteases alcalinas robustas, com alta atividade e estabilidade, amplamente empregadas em processos industriais devido à sua resistência a condições extremas de pH e temperatura.

A enzima alfa-amilase também apresentou alta atividade enzimática e consistência nos testes realizados. Sua atividade no gênero *Bacillus* é caracterizada pela secreção reprodutível e adaptabilidade a diferentes substratos e condições metodológicas (ELYASI FAR et al., 2020). A literatura corrobora esses resultados, com ensaios repetidos e ampla utilização de *Bacillus* spp. como uma fonte confiável da enzima. No estudo de HAMBURGER et al. (2025), que monitorou o crescimento e a atividade da alfa-amilase em várias cepas transformadas de *Bacillus subtilis*, observou secreção consistente e alta atividade enzimática em diversas fases de crescimento e sob diferentes condições experimentais, confirmando a robustez e estabilidade da produção dessa enzima no gênero *Bacillus*. Esses achados reforçam que a produção de alfa-amilase por *Bacillus* spp. é uma característica conservada, estável e ecologicamente adaptada, consolidando esse gênero como uma fonte

confiável e de alto desempenho enzimático para aplicações biotecnológicas (HAMBURGER et al., 2025).

Bacillus amyloliquefaciens demonstrou um perfil homogêneo com altos índices de atividade para alfa-amilase, alinhando-se com diversas pesquisas que destacam essa espécie como um excelente produtor de amilases (ABD-ELHALIM et al., 2023). Essas enzimas são amplamente reconhecidas por sua capacidade de degradar amido, apresentando grande estabilidade térmica e eficácia em processos industriais como na produção de alimentos, biocombustíveis, e no setor têxtil. Estudos recentes indicam que o gênero *Bacillus*, especialmente *B. amyloliquefaciens*, é uma das principais fontes bacterianas para produção comercial de alfa-amilase, valorizadas pela resistência a condições industriais severas e alta produtividade enzimática (ABD-ELHALIM et al., 2023).

A atividade moderada de fitase observada nos presentes resultados está em consonância com diversos estudos de triagem enzimática em *Bacillus* spp., que demonstram um padrão característico de produção enzimática neste gênero bacteriano. O estudo de JAVAID; YASINZAI e SAEED KIYANI (2022), sobre a produção otimizada de fitase por uma cepa de *Bacillus subtilis*, demonstrou que, embora essa bactéria seja capaz de produzir fitase extracelular com atividade significativa, essa produção é geralmente menor e menos explorada em comparação com a abundância e rendimento de outras enzimas extracelulares como alfa-amilase e protease no gênero *Bacillus*, enzimas mais prevalentes e com maior histórico de otimização e aplicação nesse gênero bacteriano.

B. subtilis apresentou a maior consistência entre as replicatas, assim como alguns isolados com atividade moderada e alta, no estudo de DALAS et al. (2025) também foi encontrada alta atividade de fitase em *Bacillus subtilis*, porém com pico de atividade enzimática em 30°C e pH ótimo de 5 e 6, o que pode explicar a ausência ou baixa atividade em alguns dos isolados testados.

Os isolados também apresentaram relativamente baixa atividade e concordância para a enzima esterase, com alguns picos pontuais para isolados das espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*. A produção de esterase em *Bacillus* spp. é frequentemente induzível e não constitutiva, ao contrário de outras enzimas como

amilases e proteases, e sua expressão pode ser induzida por substratos específicos ou condições de estresse (SAYALI; SADICHHA; SUREKHA, 2013). Segundo o estudo de SEKHON; KHANNA e CAMEOTRA (2011), o azeite de oliva foi o melhor indutor de atividade de esterase em uma cepa de *B. subtilis*, mesmo indutor utilizado no presente trabalho. Porém, a baixa presença de isolados positivos pode estar relacionada com as condições do experimento, no estudo descrito por GANGOLA et al. (2018) foi observado um aumento significativo na concentração de esterase em uma cepa de *B. subtilis* após a presença de cipermetrina, um inseticida, indicando que a expressão de esterase pode ser ativada em resposta a xenobióticos específicos.

A menor atividade enzimática e concordância entre replicatas foram observadas para celulase e lipase. Estas informações podem indicar uma maior especificidade dos isolados às condições dos testes, influenciando no resultado. No estudo de MALIK e JAVED (2021) foram testadas quatro fontes de carbono para os testes de celulase em uma cepa de *B. subtilis*, a maior atividade observada foi na presença de carboximetilcelulose (CMC), mesma fonte utilizada no presente trabalho, porém, a atividade máxima foi obtida em 72 horas de incubação, o que pode explicar a baixa atividade enzimática encontrada nos isolados testados.

Foram observados picos de produção enzimática de celulase em isolados das espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*, o que vai ao encontro com outros estudos da literatura que mostram estas espécies como produtoras conhecidas desta enzima, incluindo sob condições extremas (MANITA SHYAULA et al., 2023; YAO et al., 2025). Já o teste enzimático para lipase apresentou o menor número de isolados com atividade e a menor consistência entre as replicatas, tendo somente isolados da espécie *B. velezensis* com resultados consistentes. Em um estudo descrito por NA et al. (2022) com 171 cepas de *Bacillus velezensis*, somente 32,7% apresentaram atividade para lipase, demonstrando menor abundância quando comparada a enzimas como protease.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar o efeito de duas variáveis independentes, a espécie bacteriana e enzima, e sua interação sobre a variável dependente, o índice enzimático. A formulação do modelo indicou que o

índice enzimático foi modelado em função das variáveis independentes: espécie bacteriana e enzima, bem como da interação entre elas, permitindo a análise dos efeitos principais de cada variável e da interação entre ambas sobre o índice enzimático. A ANOVA bifatorial indicou a interação espécie × enzima altamente significativa, sem efeito principal de enzima e com efeito de espécie mais discreto. Esse achado sugere que a atividade enzimática depende da combinação específica entre o isolado bacteriano e a enzima, e que a relação entre eles não é uniforme.

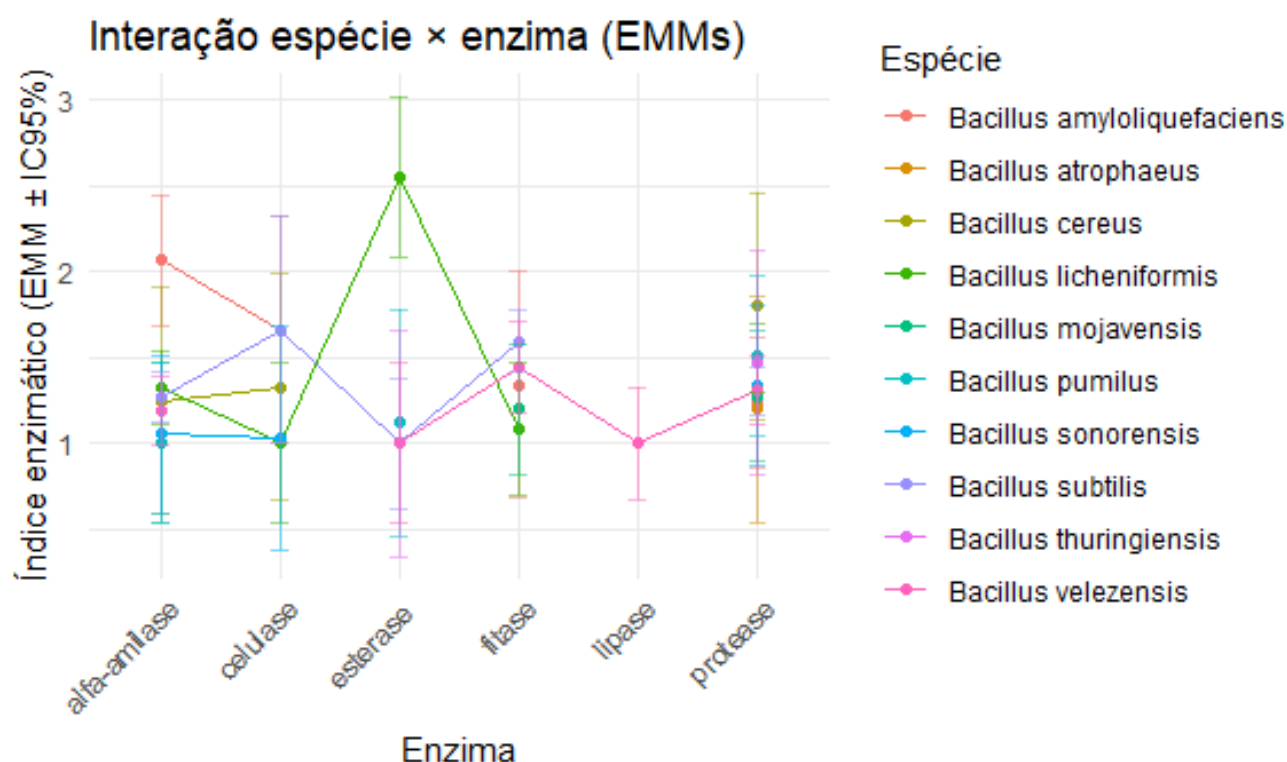
A interpretação dos resultados da ANOVA mostra que a soma dos quadrados das variáveis forneceu achados sobre como cada fator contribui para a variação no índice enzimático. O erro padrão residual, que mede a dispersão dos dados em relação ao modelo ajustado, foi de 0.3331728. Esse valor sugere que o modelo se ajusta bem aos dados, já que quanto menor for o erro padrão, melhor é o ajuste do modelo (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados análise estatística ANOVA

Termo	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados (SS/df)
Espécie bacteriana	1.705046	9	0.18945
Enzima	1.001716	5	0.20034
Espécie bacteriana x enzima	6.384281	19	0.33602
Resíduos	13.320497	120	0.11100

Esses resultados indicam que tanto as variáveis independentes (espécie bacteriana e enzima) quanto a sua interação têm um impacto significativo sobre o índice enzimático, mostrando que as linhas das espécies não são paralelas e, por vezes, se cruzam, o que indica que a atividade enzimática varia conforme a combinação entre isolado e enzima. Dessa forma, não existe uma melhor enzima que seja válida para todos os isolados, o desempenho relativo das espécies muda entre as enzimas (Figura 15).

Figura 15: Análise estatística da interação enzima-espécie



Em suma, a análise de ANOVA sugere que as variáveis estudadas, espécie bacteriana e enzima, bem como sua interação, influenciam significativamente o índice enzimático. Isso destaca a importância de explorar com maior profundidade a natureza dessa interação para entender melhor os resultados obtidos. Utilizou-se duplicata devido a limitações de tempo e recursos, prática comum em estudos exploratórios e compatível com o escopo do trabalho. O objetivo foi comparar tendências gerais de comportamento enzimático entre espécies e enzimas, e os resultados devem ser interpretados como exploratórios.

A produção de enzimas extracelulares por *Bacillus* spp. oferece um grande potencial para diversas aplicações industriais, mas para otimizar esse processo em larga escala, é necessário um ajuste cuidadoso de fatores como a escolha da cepa, as condições ambientais e a oferta de substratos. Cada cepa de *Bacillus* apresenta características únicas que influenciam a produção enzimática, sendo essencial selecionar a cepa adequada para cada tipo de aplicação industrial.

A oferta de substratos também desempenha um papel crucial, pois a escolha do substrato afeta diretamente a indução e a atividade das enzimas. A otimização desses fatores é indispensável para garantir a máxima produção enzimática, o que pode ser alcançado por meio de uma análise detalhada das condições ideais para cada enzima e cepa. No entanto, ao se transitar para a escala industrial, surgem novos desafios, além de considerações econômicas que impactam a viabilidade do processo.

Para explorar plenamente o potencial da produção enzimática por *Bacillus* spp., é fundamental considerar a interação entre todos esses fatores e ajustá-los de forma integrada. Apenas com um controle preciso e personalizado das condições de cultivo e substratos será possível não só maximizar a produção enzimática, mas também garantir a viabilidade e a eficiência econômica do processo em escala industrial. A continuidade da pesquisa nesse campo é essencial para superar os desafios existentes e otimizar a produção de enzimas extracelulares para uso em diversas indústrias.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou que *Bacillus* spp. apresentam notável capacidade de expressão de enzimas extracelulares, incluindo alfa-amilases, celulasas, esterases, fitases, lipases e proteases. Verificou-se que o perfil enzimático, bem como a intensidade dos índices enzimáticos, variaram entre os diferentes isolados e entre as espécies analisadas. As espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* destacaram-se pela elevada diversidade enzimática e/ou pelos altos valores de índice enzimático obtidos. Dessa forma, os resultados obtidos reforçam o potencial biotecnológico de *Bacillus* spp. como fontes relevantes de enzimas extracelulares, contribuindo para sua aplicação em diversos setores industriais e de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALIM, B. T. et al. Optimizing alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* on bread waste for effective industrial wastewater treatment and textile desizing through response surface methodology. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 19216, 6 nov. 2023.
- ABDELLA, M. A. A.; AHMED, S. A. Stable protease from *Bacillus licheniformis*-MA1 strain: statistical production optimization, kinetic and thermodynamic characterization, and application in silver recovery from used X-ray films. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, 5 maio 2025.
- ABDEL-MONEIM, A. E. et al. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* spores on growth performance, oxidative status, and digestive enzyme activities in Japanese quail birds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 671–680, 2020. DOI: 10.1007/s11250-019-02055-1.
- ABDELMONAEM, M. et al. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 48, p. 8243–8247, 29 nov. 2010.
- ABREU, R. et al. Antimicrobial Drug Resistance in Poultry Production: Current Status and Innovative Strategies for Bacterial Control. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 953, 6 abr. 2023.
- ACHARYA, B.; SUBEDI, S. Efficient extraction and optimization of amylase and protease from *Bacillus* species: a comprehensive study. **Journal of Applied Research in Plant Sciences**, v. 6, n. 1, p. 34–47, 2025.
- ADETILOYE et al. Optimization of thermostable amylolytic enzyme production from *Bacillus cereus* isolated from a recreational warm spring via Box Behnken design and response surface methodology. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, 19 abr. 2025.
- ADIGÜZEL, A. O. Production and characterization of thermo-, halo- and solvent-stable esterase from *Bacillus mojavensis* TH309. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 3, p. 210–226, 23 jan. 2020.

AGUILAR-PAREDES, A. et al. Microbial Community in the Composting Process and Its Positive Impact on the Soil Biota in Sustainable Agriculture. **Agronomy**, v. 13, n. 2, p. 542, 14 fev. 2023.

AKOH, C. C. et al. GDSL family of serine esterases/lipases. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 6, p. 534–552, nov. 2004.

AL-ABDALL, A. H.; AL-KHALDI, E. M. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. **Afr J Biotech**, v. 15, n. 26, p. 1413-1416, 2016.

ALMEIDA, E. D. C. Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias Bioprospectadas de Solo do Cerrado. **Ufgd.edu.br**, 2024.

ALVES, B. A. **Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico**. Disponível em: [Biblioteca Digital de Teses e Dissertações: Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico](#).

AMIN, O. E. et al. Optimization of protease production by newly isolated *Bacillus* sp. from the Red Sea using defatted soybean cake. **Scientific reports**, v. 15, n. 1, p. 32118, jan. 2025.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K.-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, n. 1, p. 177–183, 24 set. 1999.

ASLAM, S.; HUSSAIN, A.; QAZI, J. I. Production of Cellulase by *Bacillus amyloliquefaciens*-ASK11 Under High Chromium Stress. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 53–61, 14 ago. 2017.

BALABAN, N. P. et al. Structural characteristics and catalytic mechanism of *Bacillus* β -propeller phytases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 8, p. 785–793, ago. 2016.

BALCI E. et al. Immobilization of esterase from *Bacillus subtilis* on Halloysite nanotubes and applications on dibutyl phthalate degradation. **Environmental Technology and Innovation**, v. 30, p. 103113–103113, 1 maio 2023.

BARZKAR, N. et al. Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 4, p. 1187–1214, 1 abr. 2021.

BECKER, J.; WITTMANN, C. Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 65, p. 118–128, 1 out. 2020.

BERNAL, S. P. F. **Avaliação do potencial Biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de Industria Têxtil**. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNIL_591fb3b235a4eed4f491db69576f8103/Details>. Acesso em: 23 out. 2025.

BHARDWAJ, K. K.; SAUN, N. K.; GUPTA, R. Immobilization of Lipase from *Geobacillus* sp. and Its Application in Synthesis of Methyl Salicylate. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 4, p. 391–398, 2017.

BHATT, P. et al. Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides. **Chemosphere**, v. 244, p. 125507, 1 abr. 2020.

BHATT, P. et al. Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, p. 125026, jun. 2021.

BOUZAIENE, T. et al. Cellulolytic *Bacillus* strain: production optimization using wheat bran under solid-state fermentation and investigation of its probiotic potential. **Sustainability**, v. 15, n. 10, art. 8394, 22 maio 2023.

BUSSLER, L. et al. Recombinant cellulase of *Caulobacter crescentus*: potential applications for biofuels and textile industries. **Cellulose**, v. 28, n. 5, p. 2813–2832, 31 jan. 2021.

CAMPOS, L. de L.; OLIVEIRA, J. C. M. D. de. Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse industrial a partir de amostras de compostagem. [S.l.: s.n.], 2020. 18 p.

CARUS, M.; DAMMER, L. The circular bioeconomy—concepts, opportunities, and challenges. **Industrial Biotechnology**, New Rochelle, v. 14, n. 2, p. 83–91, 2018.

CHEN, W.; YU, H.; YE, L. Comparative Study on Different Expression Hosts for Alkaline Phytase Engineered in *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 6, p. 997–1010, jul. 2016.

CHEN, Y. et al. Effect of beating on recycled properties of unbleached eucalyptus cellulose fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 730–736, 1 jan. 2012.

CHOUHAN, D. K.; JAISWAL, D. K.; GAURAV, A. K.; MUKHERJEE, A.; VERMA, J. P. PGPM as a potential bioinoculant for enhancing crop productivity under sustainable agriculture. In: RAKSHIT, A.; MEENA, V. S. M. P.; SINGH, H. B.; SINGH, A. K. (orgs.). **Biofertilizers**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2021. p. 221–237.

COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308–8314, nov. 2010.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

CUESTA, S. M.; RAHMAN, S. A.; FURNHAM, N.; THORNTON, J. M. The classification and evolution of enzyme function. **Biophysical Journal**, v. 109, p. 1082–1086, set. 2015.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, abr. 2011.

DALAS, M. S. et al. **The Effect of Phytase Enzyme Extracted from *Bacillus subtilis* Bacteria on Water Bioremediation and Immune Parameters**. Disponível em:

<<https://www.pjoes.com/The-Effect-of-Phytase-Enzyme-Extracted-nfrom-Bacillus-subtilis-Bacteria-on-Water,202200,0,2.html>>. Acesso em: 17 out. 2025.

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1782, 4 ago. 2020.

DEMİRKAN, E.; AYBEY ÇETİNKAYA, A.; ABDOLU, M. Lipase from New Isolate *Bacillus cereus* ATA179: Optimization of Production Conditions, Partial Purification, Characterization and Its Potential in the Detergent Industry. **TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY**, 2021.

DEMIRKAN, E.; BAYGIN, E.; USTA, A. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 206–214, 2014.

DIAZ-CHUQUIZUTA, H. et al. Inoculation of *Bacillus subtilis* in acidic soil amended with biochar and liming materials in maize cultivation. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 6 ago. 2025.

DIXIT, N.; D, R.; DIXIT, K. Bioprospecting Microbial Isolate and Environmental Samples for Biotechnological Potential. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 14, n. 4, p. 1626–1636, 23 abr. 2025.

DUARTE, J. G. et al. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**, v. 177, p. 123–129, 8 mar. 2016.

DUMAS, M. D. et al. Impacts of Poultry House Environment on Poultry Litter Bacterial Community Composition. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24785, 16 set. 2011.

EL-KHAMISI, E. F. et al. Optimization, gene cloning, expression, and molecular docking insights for enhanced cellulase enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* strain elh1. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. –, 2 jul. 2024.

ELSABABTY, Z. E. et al. Purification, biochemical characterization, and molecular cloning of cellulase from *Bacillus licheniformis* strain Z9 isolated from soil. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, 22 fev. 2022.

ELSHAGHABEE, F. M. F. et al. Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 10 ago. 2017.

ELYASI FAR, B. et al. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350–358, 1 jul. 2020.

ERRINGTON, J.; VAN DER AART, L. T. Microbe profile: Bacillus subtilis: Model Organism for Cellular development, and Industrial Workhorse. **Microbiology**, v. 166, n. 5, p. 425–427, 11 maio 2020.

FATIMA, S. et al. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 445–458, 17 set. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). GRAS Notice No. 714: Subtilisin from Bacillus amyloliquefaciens. **U.S. Department of Health and Human Services**, 2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). GRAS Notice No. 664: Alpha-amylase from Bacillus licheniformis. **U.S. Department of Health and Human Services**, 2024.

FOUDA, A. et al. A thermo-tolerant cellulase enzyme produced by Bacillus amyloliquefaciens M7, an insight into synthesis, optimization, characterization, and bio-polishing activity. **Green Processing and Synthesis**, [S.l.], v. 12, n. 1, 1 jan. 2023.

GANGOLA, S. et al. Presence of esterase and laccase in Bacillus subtilis facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 24 ago. 2018.

GASPARINI, G. B. F. B. et al. Psychrotrophs in raw milk: effect on texture, proteolysis index, and sensory evaluation of smoked provolone cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 8, p. 3291–3296, 18 mar. 2020.

GIGRÔ - SERVIÇOS INTERATIVOS. **Reutilização da cama aviária: manejo e cuidados** - Portal do Agronegócio. Disponível em:

<<https://www.portaldoagronegocio.com.br/pecuaria/avicultura/artigos/reutilizacao-da-cama-aviaria-manejo-e-cuidados>>. Acesso em: 13 nov. 2025.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; ARSHAD, M. K. M.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, Art. ID 1272193, 9 p., fev. 2017.

GU, Y. et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 109–121, 1 nov. 2018.

GULERIA, S. et al. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 134–143, set. 2016.

GUPTA, S.; BHATTACHARYYA, P.; KULKARNI, M. G.; DOLEŽAL, K. Growth regulators and biostimulants: upcoming opportunities. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, e1209499, 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1209499.

GÜRKÖK, Sümeyra. Microbial enzymes in detergents: a review. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, v. 10, n. 9, p. 75-81, 2019.

HAMBURGER, F. et al. Automation-aided construction and characterization of *Bacillus subtilis* PrsA strains for the secretion of amylases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 23 jan. 2025.

HARWOOD, C. R.; KIKUCHI, Y. The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 1, 19 ago. 2021.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.

HERNANDEZ-PATLAN, D. et al. Whole-Genome Sequence and Interaction Analysis in the Production of Six Enzymes From the Three *Bacillus* Strains Present in a

Commercial Direct-Fed Microbial (Norum™) Using a Bliss Independence Test. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 22 fev. 2022.

HERRMANN, L. W. et al. Bacillus genus industrial applications and innovation: First steps towards a circular bioeconomy. **Biotechnology Advances**, v. 70, p. 108300, 2024.

HESHAM, A. E. L.; KAUR, T.; DEVI, R.; KOUR, D.; PRASAD, S.; YADAV, N.; SINGH, C.; SINGH, J.; YADAV, A. J. Current trends in microbial biotechnology for agricultural sustainability: conclusion and future challenges. In: **Environmental and Microbial Biotechnology**. [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 555–572.

INAN BEKTAS, K. et al. Isolation and characterization of detergent-compatible amylase-, protease-, lipase-, and cellulase-producing bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 9 mar. 2023.

ISLAM, M. et al. Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus sp.* **Malaysian Journal of Halal Research**, v. 2, n. 2, p. 19–24, 1 dez. 2019.

JAIN, J.; SAPNA; SINGH, B. Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 159–169, fev. 2016.

JAVAID, A.; YASINZAI, M.; SAEED KIYANI, K. **Enhanced Phytase Production from Indigenous Bacillus subtilis KT004404 by Response Surface Methodology to be Used as Poultry Feed Supplement**. Disponível em: <<https://researcherslinks.com/current-issues/Enhanced-Phytase-Production-Indigenous-Bacillus-subtilis/20/1/5743/html>>. Acesso em: 17 out. 2025.

JIANG, C. et al. Genetic engineering for enhanced production of a novel alkaline protease BSP-1 in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 977215, 30 ago. 2022.

JOSÉ, M.; SÂMIA MARIA TAUKE-TORNISIELO. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. v. 27, n. 2, p. 205–211, 1 jun. 2004.

KAMILARI, E. et al. *Bacillus safensis* APC 4099 has broad-spectrum antimicrobial activity against both bacteria and fungi and produces several antimicrobial peptides, including the novel circular bacteriocin safencin E. **Applied and environmental microbiology**, v. 91, n. 1, p. e0194224, 2025.

KASPAR, F. et al. Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 103, p. 7367–7381, 2019.

KETTERINE CARVALHO, J. et al. Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00630, 1 jun. 2021.

KHADKA, S. et al. Production Optimization and Biochemical Characterization of Cellulase from *Geobacillus* sp. KP43 Isolated from Hot Spring Water of Nepal. **BioMed Research International**, London, v. 2022, p. 1–12, 12 maio 2022.

KHARDZIANI, T. et al. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for Spore Production in Submerged Fermentation of Plant Raw Materials. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 4, p. 435–443, 10 jul. 2017.

KUEBUTORNYE, F. K. A. et al. Probiotic *Bacillus* species in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 87, p. 820–828, 2019.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 280696, p. 1–10, 2011.

KULKARNI, K.; JAIN, N.; BABU, G. L. S. Sustainable bioremediation and reuse of heavy metal-contaminated dredged sediments using *Bacillus subtilis*. **Biodegradation**, v. 36, n. 3, p. 32, Winter 2025.

KUMAR BHARDWAJ et al. Optimization of culture conditions by response surface methodology for production of extracellular esterase from *Serratia* sp. EST-4. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 8, p. 101603–101603, 1 dez. 2021.

LI, J. et al. A molecular imaging tool for monitoring carboxylesterase 2 during early diagnosis of liver-related diseases. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 377, p. 133122, 6 dez. 2022.

LISZKA, M. J. et al. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 1, p. 77–102, 15 jul. 2012.

LOPES, M. J. DOS S. et al. Biotecnologia microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e356101220585–e356101220585, 24 set. 2021.

MACHADO, L. et al. Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 1923–1933, 24 out. 2022.

MAESTER, T. C. et al. Exploring Metagenomic Enzymes: A Novel Esterase Useful for Short-Chain Ester Synthesis. **Catalysts**, v. 10, n. 10, p. 1100, 23 set. 2020.

MAGLIONE, G. et al. Microbes' role in environmental pollution and remediation: a bioeconomy focus approach. **AIMS Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 723–755, 1 jan. 2024.

MALIK, W. A.; JAVED, S. Biochemical Characterization of Cellulase From *Bacillus subtilis* Strain and its Effect on Digestibility and Structural Modifications of Lignocellulose Rich Biomass. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 20 dez. 2021.

MANITA SHYAULA et al. Characterization of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. **International Journal of Microbiology**, v. 2023, p. 1–12, 31 ago. 2023.

MARTINS, P. A. **Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação**. Universidade de Brasília: [s.n.].

MELLO, D. DE . **Teores de Elementos Potencialmente Tóxicos em Solo com Adição de Cama de Aviário e Calcário**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná,: [s.n.].

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, 13 jul. 2020.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 437–449, 1 jun. 2012.

MSHELIA MUSA SAIDU et al. **Utilising Microflora from Poultry Litter Effluent for Bioremediation of Lead and Nickel Polluted Soil in Maiduguri, Borno State - Arid-zone Journal of Basic & Applied Research (AJBAR)**. Disponível em: <<https://azjournalbar.com/utilising-microflora-from-poultry-litter-effluent-for-bioremedi>

MUSHTAQ, Q. et al. Amylase and Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus subtilis* Using Acid Treated Potato Peel Waste. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1106–1106, 29 maio 2024.

NA, H.-E. et al. The safety and technological properties of *Bacillus velezensis* DMB06 used as a starter candidate were evaluated by genome analysis. **LWT**, v. 161, p. 113398, maio 2022.

NADAROGLU, H.; POLAT, M. S. **Chapter 6 - Microbial extremozymes: Novel sources and industrial applications**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128229453000191>>.

NARMUKHAMEDOVA, M. et al. Identification and study of extracellular enzymatic activity of *Bacillus velezensis* isolated from saline soils of the Fergana Valley. **Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies**, v. 9, n. 1, p. 12–16, 30 jun. 2025.

PARK, S.-A. et al. *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 827–848, 23 fev. 2021.

Posit team (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R. **Posit Software**, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.

PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 6, p. 2327–2342, 2021.

Protease mechanisms | Learn Science at Scitable. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/content/protease-mechanisms-14462487/>>.

RATHOD B. G.; PANDALA S.; POOSARLA V. G. A Novel Halo-Acid-Alkali-Tolerant and Surfactant Stable Amylase Secreted from Halophile *Bacillus siamensis* F2 and Its Application in Waste Valorization by Bioethanol Production and Food Industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 195, n. 8, p. 4775–4795, 12 maio 2023.

RAZZAQ, A. et al. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 110, 12 jun. 2019.

REDDY, N. et al. Production, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as the substrate. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115403, nov. 2022.

RIZWANUDDIN, S. et al. Microbial phytase: Their sources, production, and role in the enhancement of nutritional aspects of food and feed additives. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 12, n. 100559, p. 100559, 1 jun. 2023.

RODRÍGUEZ, P. et al. Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. **Waste Management**, v. 93, p. 63–71, jun. 2019.

RONZON, T. et al. Bioeconomy and circular economy indicators for sustainable production. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 263, p. 121–132, 2020.

ROSA, A. **Fertilidade do Solo e Acúmulo de Metais Pesados em Latossolo Adubado com Dejeitos de Animais**. Universidade Estadual do Paraná: [s.n.].

RUTKOWSKA, N.; MAURYCY DAROCH; MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, O. Exploring the diversity and genomics of cultivable *Bacillus*-related endophytic bacteria from the medicinal plant *Galium aparine* L. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 30 jun. 2025.

SAEED, H. et al. Optimization and characterization studies of poultry waste valorization for peptone production using a newly Egyptian *Bacillus subtilis* strain. **AMB Express**, v. 15, n. 1, 13 jan. 2025.

SAHU, G. K.; MARTIN, M. Optimization of growth conditions for the production of extracellular lipase by bacterial strains from dairy industry effluents. **Biotechnol Bioinf Bioeng**, v. 1, n. 3, p. 305-311, 2011.

SARSAIYA, S. et al. The dynamic of cellulase activity of fungi inhabiting organic municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 411–415, mar. 2018.

SARWAN, J. et al. Isolation and characterization of novel *Bacillus* with dual enzymes, biodegradation potential: a special reference to cellulolytic and proteolytic activities. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 15, n. 3, p. 4167–4183, 7 fev. 2024.

SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, p. 1583-1594, 2020.

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. **Microbial Esterases: An overview**. Disponível em: <<https://www.ijcmas.com/vol-2-7/Kulkarni%20Sayali,%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2025.

SEKHON, K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 49, 2011.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SHAD et al. Production, Partial Purification and Characterization of Protease through Response Surface Methodology by *Bacillus subtilis* K-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 67, 1 jan. 2024.

SHAH, B. A. et al. Microbial degradation of contaminants of emerging concern: metabolic, genetic and omics insights for enhanced bioremediation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 19 set. 2024.

SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, jun. 2017.

SHARMA, N. et al. Microbial Enzymes in Industrial Biotechnology: Sources, Production, and Significant Applications of Lipases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 52, 31 dez. 2024.

SHI, B. Q. The determination of phytic acid and its extraction process. **Modern Food**, 2017.

SHIN, W.-R. et al. Biochemical characterization and molecular docking analysis of novel esterases from *Sphingobium chungbukense* DJ77. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 403–411, jan. 2021.

SHUKLA, M.; GHAROTE, A.; MUCHAHARY, S. Industrial scope of cysteine protease and its anti-gluten property: A review. **Food Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 100006, 8 maio 2025.

SI, J.-B. et al. Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 2, p. 176–182, mar. 2018.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of Microbial α -amilase in Industry - A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 850–861, out./dez. 2010.

SUMI, C. D. et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 93–103, fev. 2015.

TARIQ, A.; ZENG, F.; GRACIANO, C.; ULLAH, A.; SADIA, S.; AHMED, Z.; MURTAZA, G.; ISMOILOV, K.; ZHANG, Z. Regulation of metabolites by nutrients in plants. **Plant Ionomics: Sensing, Signaling, and Regulation**, 2023, p. 1-18.

TARIQ, H. et al. Bacillus and Paenibacillus as plant growth-promoting bacteria in soybean and cannabis. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 2 jun. 2025.

The Role and Applications of Amylase in Food Processing. Disponível em: <<https://foodsafety.institute/food-biotechnology/role-applications-amylase-food-processing/>>..

TULI, D. K.; ARINDAM KUILA. **Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases**. [s.l.] Elsevier, 2021.

OLIVEIRA, C. C. DE . **A pressão seletiva adicional promovida pelo uso prolongado de antimicrobianos na produção intensiva favorece a emergência de metabólitos e mecanismos de resistência, enriquecendo ainda mais o repertório genético e enzimático dessas populações** . Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: [s.n.].

ORTIZ, A. et al. Bioengineering Bacillus spp. for Sustainable Crop Production: Recent Advances and Resources for Biotechnological Applications. **Journal of Plant Growth Regulation**, 14 nov. 2024.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Solid-state fermentation for Bacillus enzyme production. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 44, p. 107–116, 2020.

VESTER, J. K.; GLARING, M. A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 17–29, 16 nov. 2014.

VUONG, P.; CHONG, S.; KAUR, P. The little things that matter: how bioprospecting microbial biodiversity can build towards the realization of United Nations Sustainable Development Goals. **npj Biodiversity**, v. 1, n. 1, 7 dez. 2022.

WANG, J. et al. Screening of cellulose-degrading bacteria and optimization of cellulase production from *Bacillus cereus* A49 through response surface methodology. **Scientific Reports**, London, v. 14, n. 1, p. 7755, 2 abr. 2024.

WAHEEB, M. S. et al. Optimized production and characterization of a thermostable cellulase from *Streptomyces thermodiastaticus* strain. **AMB Express**, v. 14, n. 1, 21 nov. 2024.

WRÓBEL, M. et al. Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 6, p. 4964, 1 jan. 2023.

WU, X. et al. Four Decades of *Bacillus* Biofertilizers: Advances and Future Prospects in Agriculture. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 187–187, 17 jan. 2025.

XU, L. et al. Biological modification and industrial applications of microbial lipases: A general review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 302, p. 140486, abr. 2025.

YANG, L.; TAN, H. Z.; LIU, S. B.; ZHAO, J. T.; HUANG, H. T.; CHEN, L.; DONG, Y.; WANG, X. Q.; WANG, F. L.; FENG, J. W. Research progress of phytic acid in feed ingredients. *Cereal Feed Industry*, v. 383, p. 53-57, 2019.

YANG, W. et al. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, Santiago, v. 17, n. 6, p. 262–267, 1 nov. 2014.]

YAO, D. et al. Enhanced extracellular α -amylase production in *Brevibacillus choshinensis* by optimizing extracellular degradation and folding environment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Boston, v. 49, n. 1, 2 out. 2021.

YAO, X. et al. Genomic Functional Analysis and Cellulase Characterization for the Enzyme-Producing Strain *Bacillus subtilis* Y4X3 Isolated from Saline–Alkaline Soil in Xinjiang, China. **Microorganisms**, v. 13, n. 3, p. 552, 28 fev. 2025.

YE, M. et al. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. **Royal Society Open Science**, London, v. 4, n. 10, p. 171012, out. 2017.

YIN, Y. et al. Development of an esterase fluorescent probe based on naphthalimide-benzothiazole conjugation and its applications for qualitative detection of esterase in orlistat-treated biosamples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1190, p. 339248, 3 nov. 2021.

ZHANG, T. et al. Recent progress in proteins regulating the germination of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, 8 jan. 2025.

ZHAO, T. et al. Research status of *Bacillus* phytase. **3 Biotech**, v. 11, n. 9, 19 ago. 2021

