

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Perfil Enzimático de *Bacillus* sp. Isolados de Ambiente Marinho

Liany Figuerêdo de Andrade Melo¹, Gabriel Olivo Locatelli^{2,3}, Christine Lamenha Luna-Finkler³, Carlos Daniel Pérez³ e Ivone Antônia de Souza⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
50740-600 Recife – PE – E-mail: lianymelo@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO)
52171-900 Recife – PE

³ Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
55608-680 Vitória de Santo Antão – PE

⁴ Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos
50740-521 Recife – PE

RESUMO

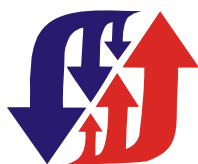
Isolados marinhos de Bacillus sp. foram investigados quanto à capacidade de produção das enzimas hidrolíticas extracelulares: amilase, celulase, esterase, fosfolipase, lipase, pectinase (poligalacturonase e pectato liase) e protease (caseinase e gelatinase). Todas as bactérias apresentaram pelo menos 4 das 9 enzimas testadas, verificado pela presença de halos em torno das colônias em meio sólido. O isolado BCL 02 produziu a maior quantidade de enzimas, enquanto BCL 04 e BCL 07 foram os menores produtores. A gelatinase foi a enzima mais frequente entre as cepas e a fosfolipase a menos frequente. De acordo com o nível de produção enzimática, as cepas foram agrupadas como não produtoras, moderadamente produtoras ou fortemente produtoras com base no índice de atividade enzimática calculado. A diversidade de enzimas encontradas nos isolados marinhos demonstra que esses micro-organismos são capazes de metabolizar uma série de substâncias distintas, indicando seu potencial de aplicação biotecnológica e industrial.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Bactérias marinhas. Hidrolases.

INTRODUÇÃO

Os representantes do gênero *Bacillus* são encontrados nos mais diversos ambientes, cada qual com características físico-químicas únicas. O sucesso dessa adaptação se deve, em parte, ao grande arsenal enzimático que lhes confere a habilidade de degradar uma gama de substratos diversos (Priest, 1977), tornando-os interessantes alvos para estudos de atividade enzimática com potencial aplicação biotecnológica e industrial (Underkofler, Barton, Rennert, 1958; Choi, Han, Kim, 2015).

No estudo dessas enzimas, busca-se não apenas cepas que apresentem uma atividade conhecida intensificada, mas também novas linhagens detentoras de outras propriedades e aplicações. Nesse contexto, incluem-se os micro-organismos presentes no ambiente marinho, cujo metabolismo é fortemente influenciado pelas condições adversas do meio, muitas vezes resultando na produção de moléculas mais potentes e diversificadas quando comparadas ao ambiente terrestre (Zhang, Kim, 2010). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o perfil enzimático de representantes do gênero *Bacillus* isolados do ambiente marinho.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

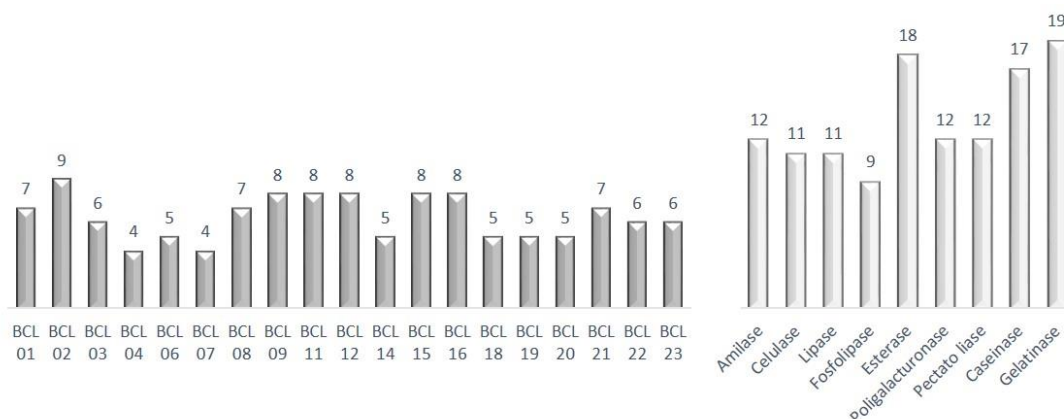
Um total de 19 isolados marinhos de *Bacillus* sp. (previamente obtidos a partir do muco do cnidário *Palythoa caribaeorum*) foram repicados em 5 mL de caldo nutriente (30°C, 500 rpm, 24h). Alíquotas de 5 µL foram inoculadas nos meios (em triplicata): ágar nutriente (Himedia) acrescido de 0,2% de amido para amilase, 5% de leite desnatado para caseinase e 1,5% de gelatina para gelatinase; ágar celulose (Kasana et al., 2008, modificado) acrescido de 2 g papel de filtro de baixa gramatura (18 g/m²) para celulase; ágar peptona (Sierra, 1957) acrescido de 1% Tween 20 para esterase e 1% Tween 80 para lipase; ágar-gema de ovo (Kashid, Ghosh, 2010, modificado) acrescido de 5 mL de gema de ovo para fosfolipase; ágar pectina (Hankin, Anagnostakis, 1975) para pectinase (pH 5,0 para poligalacturonase e pH 7,0 para pectato liase).

Após incubação a 30°C por 48h, a presença de atividade enzimática foi confirmada pela visualização de halos em torno das colônias. O diâmetro das colônias e dos halos foi medido em milímetros e a mediana dos valores das triplicatas foi empregada no cálculo da zona de precipitação (Pz), que corresponde à razão entre o diâmetro das colônias e o diâmetro dos halos (Price, Wilkinson, Gentry, 1982). Os resultados foram expressos nas categorias **A** (Pz = 1; sem atividade enzimática), **B** (0,63 < Pz < 1; atividade enzimática moderada) ou **C** (Pz ≤ 0,63; forte atividade enzimática).

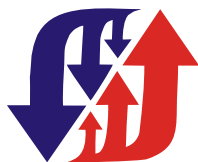
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as cepas apresentaram atividade enzimática para **aopele** menos 4 das 9 enzimas avaliadas (Tabela 1), o que comprova a diversidade metabólica do gênero *Bacillus*, com potencial para a exploração industrial (Zhang, Kim, 2010; Choi, Han, Kim, 2015). O isolado BCL 02 foi o maior produtor de enzimas, com resultado positivo em todos os ensaios (9/9 enzimas), enquanto BCL 04 e BCL 07 produziram o menor número (4/9 enzimas) (Figura 1).

Figura 1 – Frequência de ocorrência de enzimas para cada cepa e total de cepas positivas por enzima



A fosfolipase foi a enzima com atividade menos frequente entre as cepas (9/19 cepas). Em contrapartida, a gelatinase foi a mais frequentemente encontrada (19/19 cepas), seguida pela esterase (18/19 cepas) e pela caseinase (17/19 cepas).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Com exceção do teste para gelatinase, em todas as enzimas foram observados casos em que houve crescimento microbiano sem que fosse detectada qualquer produção enzimática (Tabela 1), o que pode ser devido à utilização de fontes alternativas de nutrientes presentes na composição do meio sem a degradação do substrato enzimático no tempo observado.

No meio para fosfolipase, não houve crescimento das cepas BCL 04, BCL 07, BCL 08, BCL 09, BCL 21, BCL 22 e BCL 23, indicando a incapacidade desses isolados em degradar a fonte de carbono em questão (

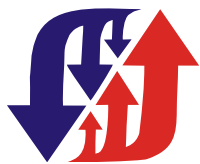
~~Tabela 1~~ Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade enzimática* de isolados marinhos de *Bacillus* sp. em meio sólido

CEPAS	<i>Amitase</i>		<i>Celulase</i>		<i>Lipase</i>		<i>Fosfolipase</i>		<i>Esterase</i>		<i>Pectinase</i> (poligalacturonase)		<i>Pectinase</i> (pectato liase)		<i>Protease</i> (caseína)		<i>Protease</i> (gelatina)	
BCL 01	0,60	C	0,16	C	1,00	A	0,53	C	1,00	A	0,66	B	0,68	B	0,53	C	0,53	C
BCL 02	0,78	B	0,22	C	0,74	B	0,70	B	0,55	C	0,29	C	0,35	C	0,73	B	0,78	B
BCL 03	0,38	C	0,23	C	1,00	A	1,00	A	0,67	B	0,33	C	0,31	C	1,00	A	0,73	B
BCL 04	1,00	A	1,00	A	0,64	B	—	—	0,47	C	1,00	A	1,00	A	0,50	C	0,49	C
BCL 06	1,00	A	1,00	A	0,77	B	0,50	C	0,47	C	1,00	A	1,00	A	0,37	C	0,50	C
BCL 07	1,00	A	1,00	A	0,64	B	—	—	0,47	C	1,00	A	1,00	A	0,35	C	0,47	C
BCL 08	0,81	B	0,23	C	1,00	A	—	—	0,53	C	0,51	C	0,42	C	0,46	C	0,61	C
BCL 09	0,43	C	0,22	C	0,82	B	—	—	0,56	C	0,57	C	0,50	C	0,27	C	0,32	C
BCL 11	0,65	B	0,26	C	0,88	B	1,00	A	0,43	C	0,36	C	0,35	C	0,44	C	0,64	B
BCL 12	0,37	C	0,23	C	0,77	B	1,00	A	0,38	C	0,26	C	0,27	C	0,36	C	0,41	C
BCL 14	1,00	A	1,00	A	0,77	B	0,83	B	0,46	C	1,00	A	1,00	A	0,42	C	0,44	C
BCL 15	0,44	C	0,23	C	1,00	A	0,50	C	0,71	B	0,26	C	0,26	C	0,60	C	0,73	B
BCL 16	0,45	C	0,23	C	1,00	A	0,55	C	0,72	B	0,28	C	0,25	C	0,60	C	0,71	B
BCL 18	1,00	A	1,00	A	0,85	B	0,55	C	0,67	B	1,00	A	1,00	A	0,46	C	0,54	C
BCL 19	1,00	A	1,00	A	0,85	B	0,50	C	0,71	B	1,00	A	1,00	A	0,46	C	0,50	C
BCL 20	1,06	A	1,00	A	0,85	B	0,45	C	0,71	B	1,00	A	1,00	A	0,39	C	0,49	C
BCL 21	0,20	C	0,16	C	1,00	A	—	—	0,46	C	0,27	C	0,27	C	0,80	B	0,75	B
BCL 22	0,75	B	0,58	C	1,00	A	—	—	0,53	C	0,45	C	0,47	C	1,00	A	0,73	B
BCL 23	0,85	B	1,00	A	1,00	A	—	—	0,74	B	0,73	B	0,70	B	0,63	B	0,66	B

* Resultados expressos como índice Pz (zona de precipitação), que representa a razão entre o diâmetro médio das colônias e o diâmetro médio dos halos. **A** (Pz=1, sem atividade enzimática), **B** (0,63<Pz<1, atividade moderada), **C** (Pz≤0,63, forte atividade) e — (Pz=0, sem crescimento).

De modo geral, os resultados demonstraram que as bactérias marinhas testadas são boas produtoras de proteinases e esterases. Essa característica pode ser explicada pelo ambiente do qual foram isoladas (muco do cnidário) que, por ser muito rico em proteínas,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

lipídios e polissacarídeos, fornece um meio seletivo para a adaptação metabólica dos isolados (Brown, Bythell, 2005). A influência do ambiente na indução da atividade enzimática pode ser bastante significativa, já que em outros trabalhos como o de Carrim *et al* (2006), os *Bacillus* spp. isolados de *Jacaranda decurrens* não apresentaram atividade enzimática para esterase e caseinase.

CONCLUSÕES

A maioria das bactérias mostrou a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares em meio sólido, principalmente proteinases e esterases. A diversidade enzimática encontrada nos isolados marinhos indica que esses micro-organismos são capazes de metabolizar uma série de substâncias distintas, o que em associação às particularidades de seu metabolismo resultantes das pressões impostas pelo ambiente em que vivem, faz dessas cepas uma fonte virtualmente inesgotável de moléculas com potencial de aplicação biotecnológica e industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown BE, Bythell JC. 2005. Perspectives on mucus secretion in reef corals. 296:291–309.
- Carrim AJI, Barbosa EC, Vieira JDG. 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Brazilian Arch Biol Technol 49:353–359. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132006000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Accessed on 8 February 2016.
- Choi J-M, Han S-S, Kim H-S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnol Adv 33:1443–1454.
- Hankin L, Anagnostakis SL. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:597–607.
- Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. Curr Microbiol 57:503–507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810533>.
- Kashid SG, Ghosh JS. 2010. Production, isolation and characterization of exotoxin produced by *Bacillus cereus* NCIM-2156 and *Bacillus licheniformis* NCIM-5343. Br J Pharmacol Toxicol 1:50–55.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20:7–14.
- Priest FG. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev 41:711–753.
- Sierra G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie Van Leeuwenhoek 23:15–22.
- Underkofler LA, Barton RR, Rennert SS. 1958. Production of microbial enzymes and their applications. Appl Microbiol 6:212–221.
- Zhang C, Kim S-K. 2010. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. Mar Drugs 8:1920–1934.