

Subárea: 2.08.05 - Bioquímica/Enzimologia e 2.08.02 - Bioquímica/Bioquímica de Microrganismos.

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE AMBIENTE HIPERSALINO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE EXTRACELULAR

Yago Queiroz dos Santos<sup>1</sup>, Ingrid Goes Medeiros<sup>2</sup>, Gabriella Silva Campos Carelli<sup>3</sup>, Bruno Oliveira Veras<sup>4</sup>, Elizeu Antunes dos Santos<sup>5</sup>.

1. Professor mestre do Instituto Federal do Ceará (IFCE)-Instituto de medicina Tropical (IMT) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
2. Graduada em ciências biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB).
3. Mestranda do programa de pós-graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) –de medicina Tropical (IMT) da universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
4. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
5. Professor/Orientador Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB).

### Resumo

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações químicas, o seu uso vem sendo uma tendência crescente nos mais variados ramos da indústria como na têxtil, farmacêutica e no processamento de alimentos. Esse fato tem impulsionado a busca por novas enzimas. Uma fonte ainda pouco explorada são os microrganismos de ambientes marinhos. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar morfofisiologicamente linhagens bacterianas de um tanque hipersalino, caracterizá-las em função da sua capacidade de produzir proteases e celulasas em variadas concentrações de NaCl. Foram identificadas um total de 7 linhagens, classificadas de acordo com o método de Gram. Um dos isolados identificado como P1.2, *Bacillus cereus* var. Mycoides demonstrou melhor atividade enzimática extracelular e foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio e as frações obtidas (F1, F2 e F3) foram utilizadas para teste de atividade enzimática e visualização das proteínas por meio de SDS-PAGE 12,5%. Apenas a F3 demonstrou atividade proteolítica in vitro e a eletroforese foi capaz de demonstrar diferentes perfis proteicos nas frações obtidas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microrganismo; enzima; protease.

**Apoio Financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

### Introdução

O ambiente marinho possui a maior diversidade biológica, variando entre organismos vivos e ecossistemas. Considerando que este ambiente apresenta variações extremas de temperatura, salinidade e pH, dentre os diversos tipos de organismos se destacam as bactérias, que habitam não só águas superficiais do mar, mas também vivem nas profundidades e em regiões costeiras. Na linhagem das bactérias gram-positivas, os microrganismos halófilos são representados pelo gênero *Bacillus* (ordem Firmicutes) em aeróbicos, e dentro dos organismos anaeróbios halófilos, estão os organismos da ordem Halanaerobiales constituído pelas famílias Halanaerobiaceae e Halobacteroidaceae (Oren, 2002). Microrganismos classificados como halofílicos necessitam de sal para o seu crescimento. Já os halotolerantes são aqueles que não necessitam exclusivamente de sal, mas que podem crescer em concentrações de até 1,25 M de NaCl (Russell, 1989).

Os microrganismos, geralmente, produzem enzimas que os macrorganismos não produzem, facilitando a sua sobrevivência em certos tipos de ambientes. As esponjas marinhas, por exemplo, têm facilidade em se associar com uma gama de microrganismos, que produzem grande quantidade de metabólitos secundários bioativos e essa produção é considerada como um mecanismo de adaptação contra predadores (Taylor, Radax, Steger, & Wagner, 2007). Entre essas enzimas estão as proteases.

As proteases são enzimas hidrolíticas que quebram as ligações peptídicas e os microrganismos são a principal fonte de proteases, devido à sua diversidade bioquímica. Pesquisadores e indústrias, estão interessados em encontrar novos microrganismos como fontes de moléculas, e especificamente enzimas. Sobre as origens de extração dos microrganismos, sabe-se que é nas fontes menos exploradas, assim como os ambientes marinhos, que se espera encontrar uma nova diversidade química (CLARDY; WALSH; 2004). Sendo assim, as enzimas estão sendo cada vez mais estudadas para melhoramento do seu processo de obtenção e isolamento.

Logo, o objetivo do presente trabalho foi selecionar e identificar uma linhagem bacteriana de origem hipersalina, secretora de enzimas hidrolíticas, determinar a molaridade de NaCl ótima para o crescimento da linhagem com melhor atividade proteolítica e purificar parcialmente proteases extracelulares.

## **Materiais e Métodos**

Uma amostra de água foi coletada em garrafa de 500 mL devidamente estéril, nas salinas de Macau no estado do Rio Grande do Norte, onde foi acondicionada em gelo e transportada ao laboratório. Posteriormente, em uma cabine de fluxo laminar, a amostra foi filtrada em membrana de 0,22 µm no intuito de reter todos os microrganismos dispersos na água e, posteriormente, a membrana foi transferida para meio líquido contendo água peptonada (1 g de peptona bacteriológica, DIFCO, em 1 litro de água destilada, pH 7,5) para o crescimento das bactérias previamente retidas. O meio líquido foi então semeado em meio ágar Luria-Bertani, incubado por 18-24 horas, a 35-37°C, para contagem e isolamento de colônias.

A partir das placas que apresentaram crescimento de colônias bacterianas, fez-se novos repiques até o isolamento total das linhagens, através da técnica de coloração de Gram (Doetsch, 1981), foi confirmada a pureza das linhagens. As linhagens foram identificadas através de espectrometria de massa (MALDI-TOF), seguindo a metodologia proposta por Lima-Neto et al. (2014)

Para detecção de atividade enzimática extracelular em placa, as linhagens foram incubadas entre 18-24 horas a 35-37°C, em meio LB. Cada uma das linhagens foi semeada em meios ricos nos polímeros alvo: gelatina e celulose; para a detecção de protease e celulase, respectivamente. Após 48 horas de incubação, para proteólise, foram adicionados 20 mL de reativo de Frazier por placa, de acordo com Smibert & Krieg (1994). Para celulasas, após 48 horas as placas foram coradas com 20 mL de corante contendo 0,66 g de I<sub>2</sub> e 1,22 g de KI por litro de água destilada. Nos casos positivos para produção enzimática, foram medidos os halos de degradação e os tamanhos das colônias formadas.

A detecção da atividade proteolítica foi feita na linhagem que apresentou alta produção de protease no meio sólido. A linhagem escolhida foi inoculada em um pré-inóculo contendo 10 g de gelatina; 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,25 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,16 g de CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O por litro, pH 7,5. Após 48h de incubação foram retirados 250 µL do pré-inóculo e inoculados em Erlenmeyer de 250 mL com mesmo meio, na ausência de NaCl e nas concentrações de 0,5M, 1M e 2M de NaCl, por 48h a 37 °C. As amostras que obtiveram resultado positivo, a partir do meio líquido, foram submetidas a quantificação proteica através do método de Bradford (1976). Para confirmação da atividade da enzima, as amostras foram comparadas com enzima controle (tripsina) e confirmadas através de absorbância a 440 nm.

Para observar a pureza das amostras, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) segundo metodologia de Laemmli (1970). As bandas proteicas foram realçadas após retirada do excesso de corante Azul de Comassie 1% do gel por solução descorante: etanol 30% e ácido acético 10%. Adicionalmente as bandas proteicas foram visualizadas por reação de redução de prata. Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados marcadores padrão de proteínas.

## **Resultados**

Sete linhagens foram isoladas a partir da amostra de água de um tanque hipersalino. Os isolados foram denominados como A1.1, A1.2, B2.1, B2.2, P1.1, P1.2 e P2. A linhagem P1.2, sendo ela Gram + e morfologia bacilar, apresentou maior atividade para proteases e celulasas, por isso foi a escolhida para ensaios posteriores, assim como as outras linhagens, foram Gram +, com formato de bacilos e estreptobacilos, Gontang e colaboradores (2007) desenvolveram diferentes meios de cultivo para sedimentos marinhos com o objetivo de observar a biodiversidade de bactérias gram-positivas, e tais estudos mostraram que a maioria dos microrganismos identificados pertenciam ao gênero *Bacillus*. Estudos têm mostrado que bactérias gram-positivas são prevalentes em ambientes hipersalinos (Banerjee, Maiti, & Roy, 2017; Sathishkumar, Ananthan, & Arun, 2015; Suthindhiran, Jayasri, Dipali, & Prasar, 2014). Tal prevalência é favorecida pela presença da camada de peptidoglicano em sua parede celular e da formação, em alguns casos, de uma cápsula de polissacarídeo.

Além da caracterização morfológica, através de observações de crescimento e coloração de Gram, foi feita a identificação da espécie por MALDI-TOF MS. Com base nas análises moleculares fenotípica e genotípica, foi possível identificar a cepa P1.2 como *Bacillus cereus* var. *Mycoides*. Os resultados mostraram significativa relação halo/colônia, para enzimas proteolítica (com diferentes concentrações de NaCl) e celulolítica. Observou-se com base na literatura (Datta Sumitra, Menon Gopalakrishnan, 2017; Kumar, Karan, Kapoor, Singh, & Khare, 2012) que microrganismos halófilos são uma ótima fonte de enzimas extracelulares, pois tendem a secretar moléculas capazes de suportar variações extremas de salinidade, temperatura e pH, apresentando sua atividade em tais circunstâncias extremas: característica importante para ser utilizado na indústria, pois oferecem melhor rendimento tornando os processos industriais mais rentáveis (VAZOLLER et al., 1999).

O isolado P1.2 conseguiu crescer em até 2M de NaCl, onde na ausência de NaCl a proporção de crescimento foi de 3,05 cm, em 0,5 M foi de 3,58 cm, em 1 M foi de 0,1 cm e a 2 M foi de 0,09 cm, comprovando assim o crescimento ótimo em 0,5 M de NaCl comprova que a P1.2 é uma bactéria halotolerante. Os resultados positivos de degradação proteica corresponderam aos crescimentos na ausência e na concentração de 0,5 M de NaCl. Por outro lado, houve uma discreta atividade proteolítica nas concentrações de 1 e 2 M. As proteases

microbianas são o grupo mais explorado de enzimas industriais (Hussain et al., 2017) e as bactérias produtoras de proteases mais importante são as espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Arthrobacter* e *Serratia* (Banik & Prakash, 2004).

Para a obtenção da protease extracelular, com base nos experimentos de crescimento da linhagem P1.2 em diferentes concentrações de NaCl, as bactérias foram cultivadas em meio líquido com 0,5 M de NaCl, incubadas, fracionada em diferentes faixas de concentração (0-30%, 30-60% e 60-90%) com sulfato de amônio. A fração na qual foi detectada a protease foi a 60-90%, chamada de F3 e posteriormente submetidas a dosagem de proteínas (Bradford, 1976), onde a fração F3 apresentou 0,191 µg/µL.

No gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%, foi possível observar que a fração F3 apresentou uma banda de aproximadamente 70 kDa, essa que não apresentou nem na F1 e nem na F2, assim provavelmente pertencem às proteínas hidrolíticas de interesse. Apesar dos resultados preliminares obtidos, uma série de estudos mais aprofundados e em uma maior escala ainda se fazem necessários para a otimização da produção das enzimas estudadas neste trabalho em ordem ao desenvolvimento de um processo robusto e com um custo-benefício viável para o bioprocessamento dos substratos aqui estudados para produtos de maior valor agregado de interesse para a indústria.

## Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível isolar e caracterizar morfológicamente sete linhagens obtidas a partir de uma amostra de água de um tanque hipersalino. Onde os microrganismos isolados constituem de Bacilos Gram positivo onde representam maior percentual de bactérias com atividade enzimática extracelular. Uma das linhagens isoladas identificada como *Bacillus cereus* var. *Mycoides* apresenta uma boa atividade extracelular proteolítica em até 2 M de NaCl. Os experimentos com SDS-PAGE revelaram proteínas solúveis extracelulares compatíveis com os dados da literatura para as proteases. Como perspectiva futura, o trabalho poderá servir de base para analisar a expressão de moléculas bioativas extracelulares de origem bacteriana, essas moléculas bioativas de origem bacteriana têm alto potencial para aplicabilidade na indústria.

## Bibliografia

- Banerjee, S., Maiti, T. K., & Roy, R. N. (2017). Protease production by thermo-alkaliphilic novel gut isolate *Kitasatospora cheerisanensis* GAP 12. 4 from *Gryllotalpa africana*. ***Biocatalysis and Biotransformation***, 2422(May). <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1306739>
- Banik, R. M., & Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. ***Microbiological Research***, 159(2), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.01.002>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical biochemistry***, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- Clardy, J., Walsh, C. Lessons from natural molecules. ***Nature*** 432, 829–837 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature03194>.
- Datta Sumitra, Menon Gopalakrishnan, V. B. (2017). Production, characterization and immobilization of partially purified surfactant- detergent and alkali-thermo stable protease from newly isolated *Aeromonas caviae*. ***Preparative Biochemistry and Biotechnology***, 47(4), 1–37. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2016.1244688>.
- Doetsch, RN (1981) Determinative Methods of Light Microscopy. Em: Gerdhardt, P., Murray, RGE, Costilow, RN, Nester, EW, Wood, WA, Krieg, NR e Phillips, GB, Eds., Manual de Métodos para Bacteriologia Geral, ***American Society for Microbiology***, Washington, DC, 21-33.
- Gontang, E. A., Fenical, W., & Jensen, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. ***Applied and Environmental Microbiology***, 73(10), 3272–3282. <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-06>.
- Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., & Iqbal, H. M. N. (2017). Alkaline Protease Production Using Response Surface Methodology, Characterization and Industrial Exploitation of Alkaline Protease of *Bacillus subtilis* sp. ***Catalysis Letters***, 147(5), 1204–1213. <https://doi.org/10.1007/s10562-017-2017-5>.
- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., & Khare, S. K. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. ***Brazilian Journal of Microbiology***, 43(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400044>.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. ***Nature***, v. 227, p. 680–685, 1970.
- Lima-Neto, Reginaldo et al. 2014. “Application of MALDI-TOF MS for Requalification of a *Candida* Clinical Isolates Culture Collection.” ***Brazilian Journal of Microbiology*** 45(2): 515–22.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>.

13. Russell, N. J. (1989). Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21(1), 93–113. <https://doi.org/10.1007/BF00762214>
14. Sathishkumar, R., Ananthan, G., & Arun, J. (2015). Production, purification and 39 characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.003>
15. Suthindhiran, K., Jayasri, M. A., Dipali, D., & Prasar, A. (2014). Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10), 1098–1109. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300563>.
16. Singh, s.; moholkar, v. S.; goyal, a. Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic bacillus amyloliquefaciens strain ss35 from rhinoceros dung. *Isrn microbiology*, v. 2013, p. 728134, 2013.
17. Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 295–347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06>
18. Vazoller, R.F.; Manfio, G.P. & Canhos, V.P. (1999). Domínio Archaea. In: Canhos, V.P. & Vazoller, R.F. (Ed). *Microorganismos e Vírus. (Série: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX.* Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M. (Orgs). Vol. 1). Editora da FAPESP, São Paulo.