

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Avaliação do potencial enzimático de actinobactérias isoladas de ambientes costeiros

Pedro Henrique de Paula Brito<sup>1</sup>, Rodrigo Pires do Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química  
Cidade Universitária, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ - E-mail: [rodrigopires@eq.ufrj.br](mailto:rodrigopires@eq.ufrj.br)

#### RESUMO

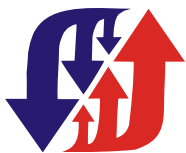
*As actinobactérias são procariotos filamentosos Gram-positivos que habitam naturalmente solos e outros habitats. Elas são conhecidas pela sua ampla versatilidade metabólica em secretar compostos bioativos, como antibióticos e enzimas. Dentre as enzimas de maior relevância, destacamos as celulases, amilases, peptidases e lipases. Assim, o presente trabalho avaliou o potencial enzimático de linhagens de actinobactérias isoladas de ambiente costeiro para a degradação de amido e celulose. 146 linhagens de actinobactérias foram inoculadas em meio de saís de Breccia contendo 1% (p/v) de carboximetilcelulose ou amido solúvel, incubadas a 28°C por 10 dias e após esse período adicionados os respectivos reveladores Vermelho Congo e Lugol. Ao todo 7 foram positivos para a amilase, apresentando um índice enzimático máximo de 3,6. Para a celulase, apenas 5 foram positivos, com índice enzimático máximo de 5,6. Estes resultados sugerem o potencial de regiões costeiras como “hot spots” no fornecimento de bactérias com potencial biotecnológico.*

Palavras-chave: Actinobactérias, Amilase, Celulase, Bioprospecção.

#### INTRODUÇÃO

As actinobactérias compreendem atualmente um dos principais filos do domínio Bacteria, onde são subdivididos em cinco classes. Destas, a classe Actinobacteria é a mais importante, e compõe cerca de 90% de todos os gêneros do filo, com 15 ordens, 43 famílias e 203 gêneros (Goodfellow, 2012). Estes microrganismos estão amplamente distribuídos em ambientes naturais, sendo o solo o seu reservatório mais comum. Mas podem ser facilmente encontrados também em águas de rios e mares, e ainda na atmosfera. Além disso, também estão presentes em ambientes antropogênicos, ou seja, aqueles transformados pelo homem, como resíduos sólidos municipais, esgotos municipais e efluentes industriais.

As actinobactérias filamentosas compreendem cerca de 45% de todos metabólitos secundários microbianos biativos conhecidos, dos quais 80% (cerca de 6.000) são produzidos pelos representantes do gênero *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Apesar disso, estima-se que apenas 10% do total de produtos naturais que poderiam ser sintetizados por estes microrganismos já foram descobertos (Watve et al., 2001). Após os antibióticos, as enzimas são os compostos bioativos mais importantes produzidos pelas actinobactérias. A vantagem da utilização de microrganismos na produção de enzimas, em substituição as tradicionais fontes animais e vegetais, diz respeito ao rendimento relativamente alto, eficiência de custos e susceptibilidade a manipulação genética. Esses microrganismos são capazes de produzir enzimas de interesse médico, como as asparaginases e peptidases; comercial, como celulases e queratinases; e ambiental, como as lipases, quitinases e lignina peroxidases.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

As enzimas microbianas podem apresentar diversas aplicações em nível industrial. Como exemplo, podemos citar as amilases, celulasas e xilanases, que são capazes de degradar o amido e a fração holocelulósica da parede celular do vegetal, considerados os polímeros naturais mais abundantes na superfície terrestre. Na indústria papelreira, por exemplo, as xilanases e lignina peroxidases participam de processos de biobranqueamento e as celulasas no processo de reciclagem do papel. Na indústria alimentícia, as xilanases e celulasas são responsáveis pelo clareamento de sucos enquanto as amilases pelo processamento dos pães e cerveja. Já na indústria têxtil as celulasas e amilases são responsáveis pelo biopolimento e estonagem e pela desengomagem das fibras teciduais. Em complemento a isso, nos dias de hoje, o aproveitamento de resíduos da agroindústria é outro assunto de grande interesse, e assim, os resíduos vegetais ricos em lignocelulose podem ser aproveitados na produção de enzimas como celulasas (Franco-Cirigliano et al, 2013) e xilanases (Nascimento et al, 2002).

Diante de um panorama biotecnológico favorável, o presente estudo objetivou avaliar o potencial enzimático (celulasas e amilases) de actinobactérias isoladas de solo arenoso e sedimento de manguezal da APA Restinga de Marambaia, Rio de Janeiro.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

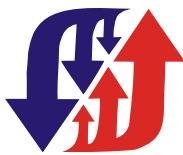
#### **ISOLAMENTO DAS ACTINOBACTERIAS**

As amostras de solo/sedimento foram coletadas a 10 cm de profundidade em 12 pontos aleatórios dentro da restinga de Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. O solo/sedimento foi coletado e armazenado em sacos plásticos estéreis, etiquetados e transportados, sob refrigeração, para a Universidade Federal do Rio de Janeiro, para posterior manipulação.

Para o isolamento das actinobactérias, foi adotada a Técnica das Diluições Seriadas, onde 10 g de solo/sedimento foram adicionados a 90 ml de solução salina 0,85% (p/v) e agitado por 20 min. A partir da amostra original, 1 ml foi adicionado a 9 ml de solução salina 0,85% (p/v) em sucessivas repetições até a diluição  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para 2 meios seletivos: (i) meio seletivo de sais minerais contendo 1% (p/v) celulose microcristalina (única fonte de carbono) e (ii) meio seletivo agar amido-caseína contendo 150 mg/L de ciclohexamida, com três réplicas. As placas foram incubadas na estufa a 28 °C, por 12 dias. Após o período de incubação, as actinobactérias foram isoladas em placas de Petri contendo meio ISP-2, para então serem acondicionadas em solução de glicerol 20% a -20°C.

#### **DETERMINAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO**

Os isolados de actinobactérias foram inoculados em meio de sais minerais (Breccia et al., 1997) suplementado com 1% (p/v) carboximetilcelulose média viscosidade ou amido solúvel (pH 7.0) e incubados a 28°C por 10 dias. Após esse período, as placas contendo carboximetilcelulose foram submetidas à revelação com solução Vermelho Congo. Após 10 minutos, as placas foram lavadas com solução NaCl 1M até o surgimento das zonas de hidrólise. Para as placas contendo amido, foi adicionado solução Lugol para revelar a formação das zonas de hidrólise. Após revelado a presença de zonas mais claras circunscrevendo o crescimento microbiano, foi calculado o Índice Enzimático (IE).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

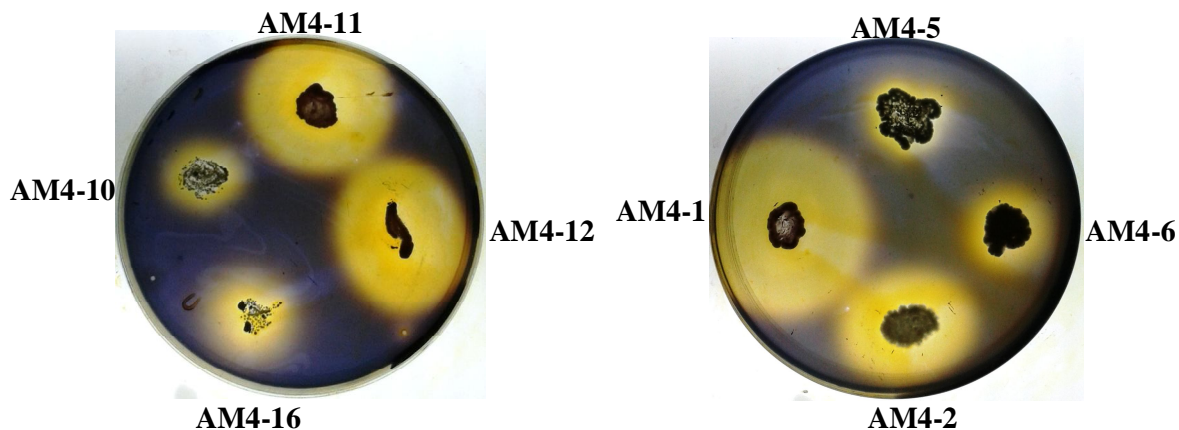
A partir de amostras ambientais coletadas da Restinga de Marambaia, Rio de Janeiro, RJ, foi possível isolar cerca de 140 linhagens de actinobactérias. Foram coletadas 9 amostras, sendo 3 de sedimento de manguezal e 6 de solo arenoso (localizados em moitas e entre-moitas). Após purificadas, as linhagens foram avaliadas quanto ao potencial em produzir celulasas e amilases. Ao todo foram detectadas 7 linhagens de actinobactérias amidolíticas e 13 celulolíticas que apresentaram índice enzimático superior a 3,0 (+++), sendo todas elas isoladas de solo arenoso (Tabela 1). Curiosamente, não foram observadas amostras promissoras no ambiente de manguezal para celulase nem para amilase. A linhagem AM4-6 apresentou o maior índice enzimático para celulase (5,2), enquanto a linhagem AM4-12 apresentou para amilase (3,7). A visualização das zonas circunscrevendo o crescimento microbiano podem ser observadas nas Figuras 1 (amilase) e 2 (celulase).

Existem poucos dados na literatura que remetem os experimentos de bioprospecção de actinobactérias. Esse é o primeiro relato da avaliação do perfil enzimático de actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia.

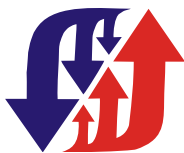
**Tabela 1** – Bioprospecção de actinobactérias celulolíticas e amilolíticas em placa de Petri, contendo CMC ou Amido

Solos e Sedimentos	Número de Isolados	Zona de Hidrólise							
		Degradação Celulose				Degradação Amido			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Solo Arenoso	120	41	12	54	13	23	33	57	7
Sedimento Manguezal	22	20	0	2	0	9	7	6	0

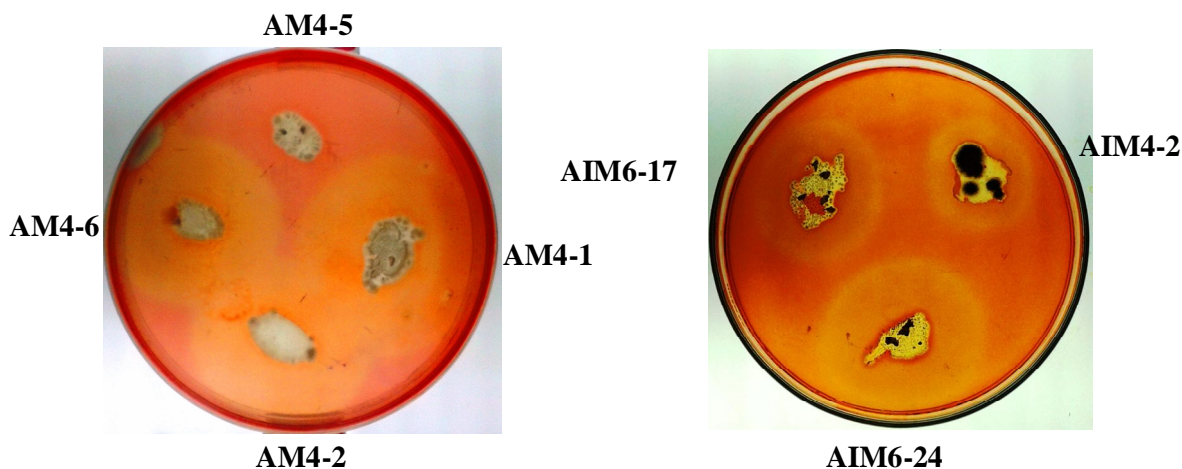
- (ausência de degradação); + (índice enzimático  $\leq 1,5$ ); ++ (índice enzimático entre 1,6 e 2,9); +++ (índice enzimático  $\geq 3,0$ )



**Figura 1** – Detecção das zonas de hidrólise de amido em Placa de Petri, pelos isolados de actinobactérias da Restinga de Marambaia.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016



**Figura 2** – Detecção das zonas de hidrólise de celulose em Placa de Petri, pelos isolados de actinobactérias da Restinga de Marambaia.

### CONCLUSÕES

Os ambientes costeiros podem ser considerados excelentes “hot spots” para a busca de novas fontes microbianas com potencial enzimático para fins biotecnológicos, com destaque especial para as actinobactérias. 75% dos isolados foram positivos para amilase, sendo destes 8% promissores (IE > 3,0). Com relação a celulase, 55% dos isolados foram positivos, sendo 9% promissores (IE > 3,0). Esses dados corroboram com a importância biotecnológica dos ambientes costeiros, sobre o aspecto microbiológico. Novos estudos deverão ser conduzidos para avaliar quantitativamente as atividades de celulase e amilase e também outras enzimas (xilanases e lipases), de modo a desenvolver bioprocessos na área de tecnologia enzimática.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bérdy J 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot vol 58, pp. 1–26
- Breccia JD, Castro GR, Baigari MD, Siñeriz F. 1995. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. J. Appl. Bacteriol. v. 78, pp. 469-472.
- Franco-Cirigliano MN, Rezende R, Gravina-Oliveira MP, Pereira PHF, Nascimento RP, Bon EPS, Macrae A, Coelho RRR. 2013. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrate. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 2013, p. 1.
- Goodfellow M. 2012. Class I. Actinobacteria Stackebrandt, Rainey and Ward-Rainey 1997, 483, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012, Volume Five The *Actinobacteria*, Part A and B. Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig, William B. Whitman, Editors. pp 34-350.
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Gírio FM, Bon EPS, Amaral-Collaco MT. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. AMT-3 isolated from a Brazilian cerrado soil. Enz Microbial Technol. vol 31, pp. 549-555.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. Arch Microbiol vol 176, pp.386–390.

**APOIO FINANCEIRO:** FINEP, FAPERJ, CNPq