

## PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS DO SOLO DA CAATINGA COMO ESTRATÉGIA DE USO SUSTENTÁVEL EM AGROECOSSISTEMAS

Sandra Rebeca Oliveira Martins (\*), Jade Oliveira Abreu, Daniel Rodrigues dos Santos, Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, Oscarina Viana de Sousa

\* Universidade Federal do Ceará – UFC e-mail: becamartins@yahoo.com.br

### RESUMO

As proteases fazem parte de um grupo variado de enzimas catalíticas que desempenham papel importante nos processos fisiológicos e aplicação em processos industriais. É crescente o interesse por enzimas provenientes de microrganismos devido à sua diversidade, complexidade e seu potencial biotecnológico. A caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com ambientes ricos em espécies que apresentam adaptações únicas. O objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias produtoras de enzimas proteolíticas e avaliar sua eficiência enzimática. Das dez cepas isoladas, duas apresentaram os melhores resultados quanto à estabilidade das enzimas expostas a diferentes condições de temperatura (4°C e 70°C) e pH (5,2 e 8,5). Os resultados mostraram que a elevada temperatura causou maior efeito sobre a atividade das enzimas proteolíticas, enquanto que, para o pH, as condições alcalinas apresentaram efeito mais rápido sobre a desnaturação dessas enzimas. A decomposição microbiana em agroecossistemas tropicais representa uma estratégia importante da manutenção da produtividade do solo e o conhecimento da atividade enzimática nesses ambientes é importante para a aplicação de em processos sustentáveis de agricultura.

**PALAVRAS-CHAVE:** proteolíticas, proteases, biotecnologia, agroecossistemas, semiárido

### INTRODUÇÃO

A Caatinga é considerada o bioma mais importante da Região Nordeste, ocupando cerca de 10% de todo o território nacional (ANDRADE *et al.*, 2005). Do ponto de vista biológico, é um ecossistema importante por ser exclusivamente brasileiro. Apresenta vasta biodiversidade, com flora e fauna únicas e é rico em recursos genéticos e variada vegetação. Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga é o menos conhecido cientificamente (WASHINGTON, *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre a microbiota desse bioma.

As bactérias constituem o principal grupo de decompositores, sendo responsáveis pela ciclagem do carbono devido a sua capacidade de degradar compostos complexos e macromoléculas (GORLACH-LIRA E COUTINHO, 2007). Os microrganismos são bons produtores de proteases, visto que, possuem grande diversidade bioquímica e fácil manipulação genética (KASANA *et al.*, 2011, NASCIMENTO E MARTINS, 2006). Além de desempenhar importantes funções nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento de ecossistemas, os microrganismos também possuem elevado potencial biotecnológico (GOI E SOUZA, 2006).

As proteases são enzimas que degradam proteínas e são amplamente distribuídas em todos os seres vivos, desempenhando funções importantes para a manutenção da vida (SILVA-LOPES, 2009). As proteases podem ser extraídas de vários microrganismos, incluindo bactérias. As enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas no comércio e na indústria e estão entre os três maiores grupos de enzimas industriais, correspondendo a 60% de toda a venda internacional de enzimas (LIMA *et al.*, 2008).

A matriz solo possui um número variado de grupos de microrganismos, dentre os quais se destacam aqueles que possam contribuir para a sustentabilidade dos agroecossistemas sendo utilizados para fins biotecnológicos e contribuindo na geração de técnicas alternativas que visam práticas mais sustentáveis (GOI E SOUZA, 2006; BARBOSA *et al.*, 2012).

O objetivo desse trabalho foi buscar em um ambiente de condições extremas de temperatura e pluviosidade, como o bioma da Caatinga, bactérias produtoras de enzimas proteolíticas e avaliar a eficiência enzimática desses isolados.

## METODOLOGIA

As amostras de solo foram coletadas no município de Morada Nova, Ceará, inserido no bioma da Caatinga e transportadas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) no Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR/UFC, onde foram processadas e analisadas.

Foram pesadas 10g de sedimento e diluídas em 90 ml (1:9, p/v) de solução salina 0,85% de NaCl, correspondendo à diluição  $10^{-1}$  e a partir dela foram feitas diluições decimais até  $10^{-5}$ . Após a diluição, as amostras foram inoculadas em Ágar Caseína do Leite (ACL), utilizando a técnica de *Pour Plate* e incubadas em estufa a 35°C por 48h. Após o período de incubação, foi feita a contagem das colônias bacterianas através do método de Contagem Padrão em Placa (CPP) (DOWNES E ITO, 2001) e foram consideradas produtoras de proteases as colônias que apresentaram halo ao seu redor (THYS, 2004).

As cepas que apresentaram halo ao redor da colônia foram isoladas e verificadas quanto à sua ação proteolítica. Os isolados bacterianos foram inoculados em Ágar Triptona de Soja (TSA), com crescimento em estufa a 35°C por 24h. No total, foram isoladas dez cepas.

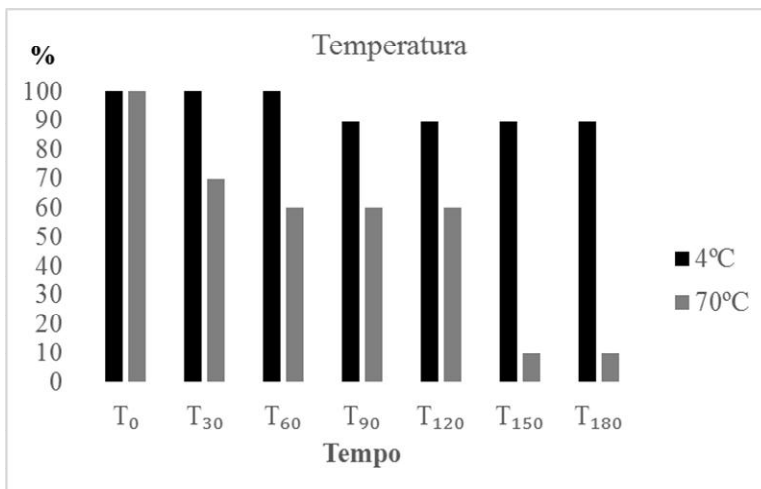
Com o intuito de otimizar a produção das proteases, as cepas foram inoculadas em Caldo Caseína do Leite (CLL) e incubadas a 35°C por 24h, sob agitação 0,4039 g. Em seguida, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C com rotação de 2236 g (NASCIMENTO E MARTINS, 2006). Após a centrifugação, foi extraído o líquido metabólico (LM) para teste de eficiência da enzima. Durante o experimento, o líquido metabólico foi distribuído em micro tubos e exposto a condições extremas de temperatura (4°C e 70°C) e pH (5,2 e 8,5) por 180 minutos ( $T_0$  a  $T_{180}$ ). A cada 30 minutos, foram retiradas alíquotas e inoculadas em Ágar Caseína do Leite para verificação da atividade. Para realização dos testes, foram feitos pequenos poços, para adição do líquido metabólico, nas placas contendo Ágar gelatina, em substituição ao Ágar Caseína do Leite.

Para a verificação da atividade enzimática nas referidas temperaturas, 0,5 ml do líquido metabólico foi inoculado e incubado em estufa BOD por 24h. A deformação do poço e o espalhamento do inóculo no meio de cultura indicaram atividade enzimática (OLIVEIRA E FOPPA, 2014).

Os valores de pH (5,2 e 8,5) foram obtidos através de soluções tampões de ácido clorídrico e acetato de sódio. Foram acrescentados em micro tubos 0,5 ml do líquido metabólico e 0,5 ml da solução (ácida ou básica), numa proporção de 1:1. A atividade da enzima foi também verificada através da deformação do Ágar.

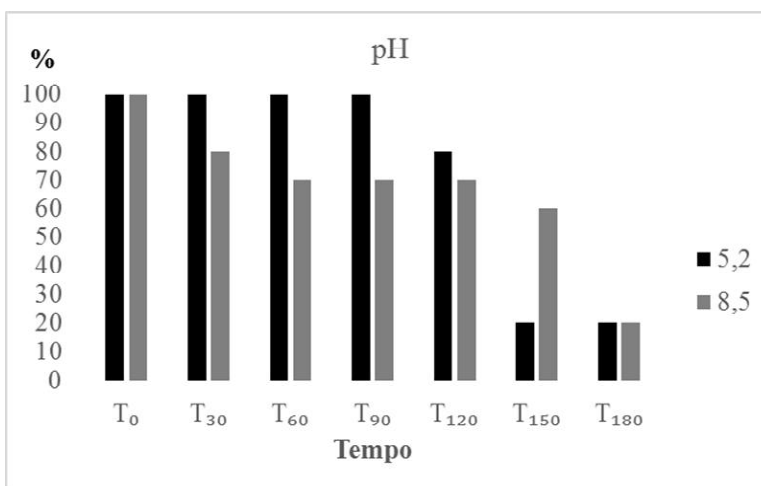
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de 4°C foi a que apresentou a maior atividade enzimática para todos os intervalos de tempo ( $T_0$  a  $T_{180}$ ). A temperatura de 70°C apresentou menor atividade, principalmente nos tempos  $T_{150}$  e  $T_{180}$ . Considerando a origem das cepas, era esperada uma maior atividade enzimática para a temperatura de 70°C, visto que o solo da Caatinga pode atingir até 60°C (MECAMBO *et al*, 2012). De modo geral, a temperatura elevada foi o fator que mais afetou a atividade das enzimas proteolíticas (Figura 1).



**Figura 1: Comportamento da atividade de enzimas produzidas por bactérias isoladas do solo da Caatinga expostas a temperaturas de 4°C e 70°C.**

Para os testes de pH, a maior atividade enzimática foi referente ao pH ácido, enquanto que a condição alcalina apresentou menor atividade enzimática e efeito mais rápido sobre a desnaturação das enzimas. Nascimento e Martins (2006), Chaud *et al.*, (2007) e Ferreira *et al.*, (2010) afirmam que o melhor valor de pH para atividade proteolítica está na faixa de 8 e 9, diferindo, portanto, do resultado encontrado no presente estudo. Até o último tempo do experimento foi detectada presença de atividade nos líquidos metabólicos das bactérias ambientais (Figura 2).



**Figura 2: Comportamento da atividade de enzimas produzidas por bactérias isoladas do solo da Caatinga expostas a pH 5,2 e 8,5.**

Do total de isolados, duas cepas apresentaram os melhores resultados para os testes de temperatura e pH, sendo consideradas as mais aptas na aplicação para fins biotecnológicos.

## CONCLUSÃO

Temperaturas elevadas apresentam maior efeito sobre a estabilidade de enzimas proteolíticas do que temperaturas baixas. Condições alcalinas de pH apresentaram um efeito mais rápido sobre a desnaturação das enzimas.

As bactérias isoladas do solo em região do semiárido são fontes potenciais de enzimas proteolíticas estáveis a variações. Em agroecossistemas tropicais a decomposição microbiana e mineralização de fontes orgânicas representa uma estratégia importante para manter a produtividade do solo. O conhecimento da diversidade e atividade enzimática nesse ambiente é fundamental para a aplicação em processos sustentáveis de agricultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade, L. A. et al., 2005. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. *Revista Cerne*, 11(3):253 - 262
2. Barbosa, P. M. G., et al., 2012. Caracterização, enriquecimento e manutenção da Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste. Embrapa Agropecuária Oeste-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA DE INICIAÇÃO À PESQUISA DA EMBRAPA, 2012, Dourados. Resumos... Brasília, DF: Embrapa; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012.
3. Chaud, L. C. S. et al., 2007. Considerações Sobre a Produção Microbiana e Aplicações de Proteases. *Nucleus*, 4(1-2).
4. Downes, M. P., Ito, K., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed, vol I. American Public Health Association, Washington.
5. Ferreira, J. F. et al., 2010. Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (*Ananas Erectifolius*).
6. Goi, S. R., Souza, F. A., 2006. Diversidade de Microrganismos do solo. *Brazilian Journal of Forestry and Environment*, 13(2):46 – 65
7. Gorlach-Lira, K., Coutinho, H. D., 2007. Population Dynamics and Extracellular Enzymes Activity of Mesophilic and Thermophilic Bacteria Isolated from Semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1): 135 - 141
8. Kasana, R. C. et al., 2011. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in Microbiology* 37:262-276.
9. Lima, S. L. T. et al., 2008. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. *Revista Química nova na escola*. 47-49.
10. Mecambo, A. et al., 2012. Bioma Caatinga. Instituto Federal Catarinense – Campus Camboriú, p. 14.
11. Nascimento, W. C. A., Martins M. L. L., 2006. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:582-588.
12. Oliveira, L. P., Foppa, T., 2014. Produção de Extrato e Avaliação Antimicrobiana de *Scleroderma* sp pelo Método de Difusão em Ágar e Confrontação Direta. *Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde*, 3(1):49-56.
13. Silva-Lopez, R. E. 2013. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Revista Fitos Eletrônica* 4(01): 108-119. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/90/89>>. Acesso em: 09 Set. 2015.
14. Thys, R. C. S., 2004. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. Kr10. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
15. Washington, F. R. et al. Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, Florianópolis, SC, Brazil (2007).