

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DE SEDIMENTO DE MANGUE DA LAGOA DO ARAÇÁ-PE.

J. L. A. CORREIA¹, T. R. dos SANTOS², A. A. da SILVA Jr³ e O. M. MARQUES⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química
^{2,3 e 4} Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: jackellinecorreia@hotmail.com

RESUMO – Este trabalho objetivou isolar e identificar bactérias autóctones, de sedimentos de mangue, a fim de realizar um levantamento do potencial enzimático para aplicação na indústria. As amostras foram coletadas em 04 pontos equidistantes da Lagoa do Araçá em Recife- PE e inoculadas em Agar Padrão para Contagem (PCA), contendo 2% de cloreto de sódio por 48 horas. As colônias crescidas nas placas foram escolhidas por diferenças nos aspectos morfológicos a fim de representar a diversidade bacteriana local. Foram isoladas 36 cepas bacterianas, 83,3% eram Gram-positivas e 17,3% Gram-negativas, sendo possível identificar por testes bioquímicos 06 gêneros e 17 espécies. O gênero *Bacillus* apresentou uma predominância significativa, chegando a 96,5% do total dos isolados. Foram identificadas 13 espécies distintas deste mesmo gênero, o que evidencia a sua importância para a microbiota do ambiente em estudo. Além do *Bacillus*, também foram identificados os gêneros *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*. Os percentuais de bactérias produtoras de enzimas amilase, protease, lipase, catalase, fosfolipase e citrato sintase, foram de 59%, 75%, 26%, 83%, 23% e 61% respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um território mega diverso, abrigando cerca de 20% de toda a diversidade biológica mundial, o que confere ao nosso país uma extraordinária competitividade diante de demandas ambientais e biotecnológicas, nas quais o capital natural pode gerar grandes benefícios econômicos e sociais quando bem administrado.

Os manguezais são um dos ecossistemas mais produtivos do planeta, tendo um papel fundamental na manutenção da biodiversidade marinha, funcionando como berçário e fonte de alimento para peixes e outros animais. Tal importância se deve principalmente para ciclagem dos nutrientes devido ao aporte de materiais sedimentares provenientes tanto do mar quanto do continente, tornando-o um ambiente de transição de alta produtividade.

Segundo o mapeamento realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (2009), os manguezais abrangem cerca de 1.225.444 hectares em quase todo o litoral brasileiro, desde o Oiapoque, no

Amapá, até a Laguna em Santa Catarina, constituindo zonas de elevada produtividade biológica, uma vez que acolhem representantes de todos os elos da cadeia alimentar. Estão morfologicamente associados a costas de baixa energia ou a áreas estuarinas, lagunares, baías e enseadas que fornecem a proteção necessária ao seu estabelecimento (Diegues, 2002).

Apesar das características de um ambiente inóspito, o manguezal é considerado um ecossistema vulnerável devido à crescente destruição desta área para construção civil, extrativismo vegetal e animal, portuária, barragens, derramamento de óleo dentre outras. Assim, a biota do manguezal vem sofrendo grande impacto, resultando em alterações no perfil de espécies, sejam elas vegetais, animais ou microbianas (Castro, 2011).

Com a redução da área de manguezais além das perdas de inúmeras espécies de flora e fauna, muitas espécies de microrganismos foram e estão sendo perdidas. Muitas destas provavelmente nunca foram descritas, as quais poderiam ser utilizadas na área biotecnológica, farmacêuticas e afins. Assim, a descrição do papel de diversidade e da comunidade microbiana em manguezais é um assunto de relevante importância, pois poucos estudos realizados com microrganismos deste ecossistema, tornando imperativa a descrição desta microbiota e a possível utilização desses microrganismos nas áreas citadas acima. (Castro, 2011; Santiago & Motta, 2006).

Considerando a importância dos estudos associados à caracterização da microbiota em sedimentos de mangue, com a finalidade identificar a biodiversidade local e a partir daí, determinar as habilidades e potenciais bioquímicos, fisiológicos e estruturais desse grupo de organismos, e levando em consideração que os estudos relacionados à utilização de microrganismos dos mangues brasileiros estão basicamente voltados à exploração do seu potencial biodegradativo para componentes petroquímicos (Fioravanti *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2009), o presente estudo se propõe isolar e identificar e avaliar o potencial enzimático das bactérias autóctones de sedimento de mangue da lagoa do araçá-PE com finalidade de manter um banco de cultura microbiana específica desse local destinada à aplicações diversas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras

Para o isolamento de bactérias autóctones, foram realizadas coletas do sedimento em 04 pontos no entorno do mangue da Lagoa do Araçá, situada no bairro da Imbiribeira, em Recife – PE. Representados pelas letras A, B, C e D, e posicionados, respectivamente, nas seguintes coordenadas geográficas 8°5'44.8509"S, 34°54'56.6894"W; 8°5'37.4325"S, 34°54'48.6556"W; 8°5'34.2587"S, 34°54'54.8740"W e 8°5'36.1706"S, 34°54'58.1957"W. As amostras foram coletadas do sedimento a uma profundidade de 10 cm, em uma superfície isenta de folhas, com o auxílio de um amostrador tipo draga e transferido para frascos de vidro previamente esterilizados. Após a coleta todas as amostras foram acondicionadas em saco estéreis, mantidas refrigeradas em isopor e levada para o laboratório.

2.2. Preparo das amostras para análise microbiológica

Foram pesados 25g de amostra em papel alumínio estéril e transferidos assepticamente para um frasco de Erlenmeyer contendo 225 ml de diluente (água salina peptonada a 0,85%) previamente esterilizado. A partir desta suspensão foram feitas diluições para frascos contendo 90ml de diluente obtendo as seguintes diluições: $1/10$, $1/10^2$, $1/10^3$.

2.3. Seleção dos microrganismos e condições de cultivo

Alíquotas de 1 ml das diluições foram semeadas pela técnica “Pour-Plate”, em Agar Padrão para Contagem (PCA), contendo 2% de cloreto de sódio e incubadas por 48 horas na temperatura de 35-37°C. Após esse período foram selecionadas colônias crescidas nas placas que apresentaram aspectos morfológicos diferentes a fim de representar a diversidade bacteriana. As colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo Agar Nutritivo e incubados a 35°C por 48 horas.

2.4. Manutenção das culturas isoladas

Todas as culturas isoladas em tubos de ensaio foram armazenadas em refrigerador a 4-5°C e subcultivadas no momento do ensaio.

2.5. Métodos de caracterização

A caracterização dos microrganismos baseou-se na chave de métodos do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005). O método consistiu em separar os microrganismos em dois grandes grupos através de coloração diferencial de Gram. Em seguida, diferenciá-los quanto à forma como bacilos ou cocos. Uma posterior coloração para identificação de produção de esporos segundo Schaeffer e Furton (1933), permitiu a caracterização do gênero. A partir daí, a definição das espécies foi feita através de testes bioquímicos variados como fermentação de açúcares, teste do vermelho de metila, teste de tolerância ao NaCl 6,5% e teste de Vogues- Proskauer (VP) de acordo com a ANVISA (2004).

2.6. Atividade Enzimática

A partir de um padrão de suspensão de células (10^7 células/ml) foram realizados os ensaios com as amostras segundo o método descrito por Hankin & Anagnostakis (1979) e Kitancharoen & Hatai (1998). Um volume de 1 ml da suspensão foi transferida para placas de Petri utilizando a técnica “Pour- Plate” contendo os diferentes meios para detecção das atividades enzimáticas.

Amilase as amostras foram inoculadas em meio Agar Nutritivo, suplementado com uma solução de amido solúvel 0,2% (pH 6.0). As culturas foram incubadas na temperatura de 37°C por 48 horas e após esse intervalo de crescimento adicionou-se uma solução de iodo a 0,1 N para revelar a atividade enzimática.

Protease as amostras foram inoculadas em meio Agar Nutritivo, acrescido de 8% de gelatina e

incubadas na temperatura de 37°C. As culturas foram incubadas por 7 dias e observadas mediante a presença de halo transparente ao redor da colônia.

Lipase a atividade lipolítica foi avaliada segundo a metodologia descrita por Beisson *et al.* (2000), utilizando meio de cultura composto de peptona (1%); cloreto de sódio (0,5%) e ágar (2%). A este meio foi adicionado 1% de Tween-80 (sorbitano monolaurato) para observação da produção de lipase.

Catalase foi medida utilizando uma suspensão bacteriana (2mL) com turbidez entre 0.8 – 1.0 (D.O600) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20%(m/v), como reagente. A reação foi considerada positiva pela presença de bolhas, que indicam a liberação de O₂.

Fosfolipase a atividade fosfolipásica foi avaliada com a utilização do método descrito por Hankin & Anagnostakis (1979). As amostras foram inoculadas em meio Sabouraud suplementado com 0,005M de cloreto de sódio, 0,005M de cloreto de cálcio e 8% de lecitina de ovo e incubadas em duas temperaturas 28°C e 37°C. As culturas foram cultivadas durante 3 dias, para determinação da atividade por meio da formação de halo.

Citrato-sintase foi determinado através da utilização do meio Citrato Simmons Ágar em tubos inclinados, incubados a 37°C por 24 horas. A reação positiva foi detectada pela mudança de cor do meio de verde para azul, onde se verifica a utilização do citrato como única fonte de carbono pelo microrganismo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível identificar 6 gêneros e 17 espécies de microrganismos utilizando o método do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) nos pontos A, B, C e D. A Tabela 1 mostra os microrganismos quanto ao Gênero e espécie. Salienta-se ainda que a bactéria *Bacillus cereus* foi a que apresentou maior percentual (22%) nos isolados e predominância em todos os pontos coletados.

Dias (2008) em seu estudo com sedimentos de manguezal da Ilha Cardoso Cananéia-SP, conseguiu identificar 238 bactérias e 15 gêneros distintos (*Vibrio*, *Listonella*, *Aeromonas*, *Microbacterium*, *Dermabacter*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Bacillus*, *Nesteronkonja*, *Kytococcus*, *Kocuria*, *Pseudomonas* e *Rothia*), sendo apenas duas destes gêneros (*Bacillus* e *Pseudomonas*) idênticos aos encontrados nesse estudo.

Segundo Garrity *et al.* (2011) o gênero *Bacillus* é composto de microrganismos ambientais cujo habitat principal é o solo onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do azoto. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam considerados ubíquos, podendo ser encontrados em diversos sedimentos de solo, além da água do mar, da água doce e gêneros alimentícios.

Tabela 1 – Levantamento geral dos microrganismos isolados

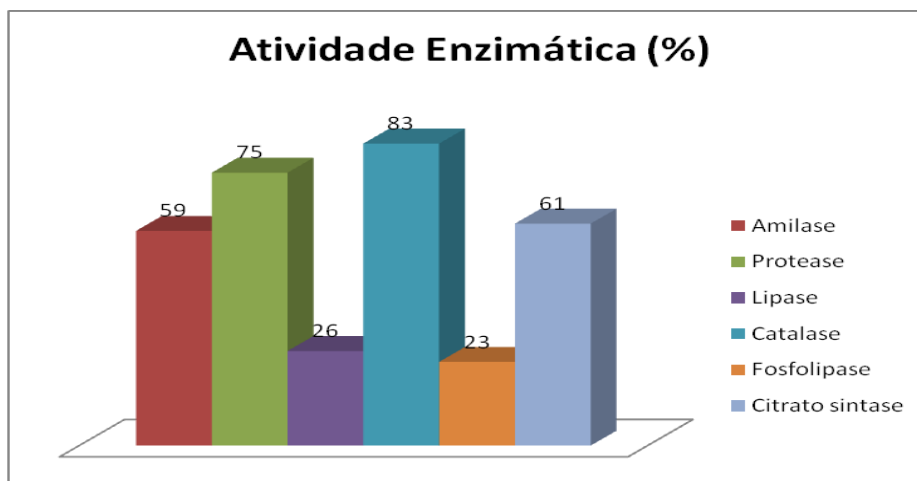
Amostra	Gênero e espécie	Amostra	Gênero e espécie
---------	------------------	---------	------------------

A1	<i>Bacillus brevis</i>	C1	<i>Bacillus megaterium</i>
A2	<i>Micrococcus</i> spp.	C2	<i>Enterobacter aerogenes</i>
A3	<i>Bacillus insolitus</i>	C3	<i>Bacillus subtilis</i>
A4	<i>Bacillus insolitus</i>	C4	<i>Escherichia coli</i>
A5	<i>Bacillus licheniformis</i>	C5	<i>Bacillus laterosporus</i>
A6	<i>Bacillus subtilis</i>	C6	<i>Bacillus sphaericus</i>
A7	<i>Bacillus azotoformans</i>	C7	<i>Bacillus laterosporus</i>
A8	<i>Bacillus megaterium</i>	C8	<i>Bacillus insolitus</i>
A9	<i>Bacillus cereus</i>	C9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B1	<i>Bacillus sphaericus</i>	C10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B2	<i>Bacillus cereus</i>	D1	<i>Bacillus insolitus</i>
B3	<i>Bacillus pasteurii</i>	D2	<i>Bacillus macquarienses</i>
B4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D3	<i>Bacillus cereus</i>
B5	<i>Bacillus pasteurii</i>	D4	<i>Bacillus cereus</i>
B6	<i>Bacillus cereus</i>	D5	<i>Bacillus cereus</i>
B7	<i>Bacillus cereus</i>	D6	<i>Bacillus cereus</i>
B8	<i>Bacillus badius</i>	D7	<i>Bacillus brevis</i>
B9	<i>Corynebacterium xerosis</i>	-	...
B10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	...

3.1. Teste de atividade enzimática

O Gráfico 1 apresenta uma avaliação da atividade enzimática dos microrganismos isolados, testadas como foi descrito na seção de materiais e métodos do presente trabalho.

Gráfico 1 - Percentual da atividade enzimática de todos os microrganismos isolados.



O teste de produção da amilase, constatado pela hidrólise do amido, foi realizado em todos os microrganismos isolados, apresentando um percentual de 59% de espécimes com atividade amilolítica. Foi possível observar a predominância quase que total de microrganismos produtores de amilase no ponto D de coleta, o que pode indicar uma composição química diferente neste trecho do mangue entorno da Lagoa do Araçá, provavelmente oriunda de interferências externas àquele ambiente.

Dos microrganismos isolados 75% apresentaram atividade proteolítica, provavelmente pelo fato de o mangue ser composto por matéria orgânica.

O percentual de bactérias quanto à atividade lipolítica positiva foi 26% com uma porção pequena de isolados concentrada no ponto C de coleta. Tais resultados podem sofrer influência da entrada e saída de água proveniente do estuário do Rio Tejiipi por meio de um canal natural pelo qual a lagoa é alimentada e que pode conter sedimentos ou microrganismos específicos.

A abundância de bactérias produtoras de catalase (83%) conforme demonstra o gráfico 1 evidencia o potencial que os microrganismos do ambiente do mangue possuem para a produção destas enzimas. A catalase é uma enzima intracelular necessária à decomposição do peróxido de hidrogênio decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico. A presença de catalase se atribui ao elevado percentual de bactérias do gênero *Bacillus* dos isolados com teste positivo para esta enzima avaliado neste trabalho.

Como é possível observar no gráfico 1, os resultados apontam um baixo percentual de atividade lipídica (26%) e fosfolipídica (23%) dos microrganismos isolados. As características bioquímicas do ambiente do mangue tradicionalmente apontariam para um resultado como este, devido à sua composição que não apresenta teores elevados de ácidos graxos. É importante enfatizar a ausência total de amostras positivas para a fosfolipase no local de coleta nomeado como B.

A presença de microrganismos com atividade da citrato sintase em todos os pontos coletados da lagoa indica que há uma elevada atividade aeróbia nesse ecossistema indicando que o ambiente apesar de urbano não apresentou indício de eutrofização por poluição orgânica. A citrato sintase também foi investigada por Almeida- Victor & Rodrigues (2009), em seu estudo sobre a investigação da hipóxia causada pela eutrofização e poluição orgânica de ambientes marinhos litorâneos através da avaliação da atividade específica de enzimas específicas.

4. CONCLUSÃO

Das 36 cepas bacterianas isoladas, 83,3% eram Gram-positivas e 17,3% Gram-negativas, sendo possível identificar por testes bioquímicos 06 gêneros e 17 espécies. O gênero *Bacillus* apresentou uma predominância significativa, chegando a 96,5% do total dos isolados. Foram identificadas 13 espécies distintas deste mesmo gênero, o que evidencia a sua importância para a microbiota do ambiente em estudo. Além do *Bacillus*, também foram identificadas os gêneros *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*. O Percentual de bactérias produtoras de enzimas amilase, protease, lipase, catalase, fosfolipase e citrato sintase, foi de 59%, 75%, 26%, 83%, 23% e 61% respectivamente. O sedimento de mangue da Lagoa do Araçá pode ser uma fonte de bactérias com potencial biotecnológico principalmente para a produção das enzimas amilases e proteases.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA - VICTOR, R.; RODRIGUES, E. Resposta metabólica aeróbia, anaeróbia e argininolítica do bagre tica do bagre *Genidens genidens*, *Genidens genidens*, presentes nos estuários dos rios Grande, Indaiá e Escuro do município de Ubatuba Escuro do município de Ubatuba. *Revista Biociências, Unitau*. v. 15, n. 1, 2009. Disponível em periodicos.unitau.br.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos- Módulo IV, 2004.
- SCHAEFFER, A. B. & FURTON, M. D. A Simplified Method of Staining Endospores. *Science*. 17 february, p. 144, 1933.
- BARBOSA, S. P. P.; CAMINHA, M. C. C.; PAZ, M. C. F. Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no município de Fortaleza. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa-PB, 2007.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÉRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, Weinheim, p. 133–153, 2000.

- CASTRO, R. A., Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga SP. Dissertação de Mestrado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2011.
- DIAS, A. C. F. Diversidade de Bactérias do Sedimento de Manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia- São Paulo. 61f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade São Paulo, São Paulo, 2008.
- DIEGUES, A. C. Povos e Águas – Inventário de áreas úmidas brasileiras. 2 ed. São Paulo. Nupaub/USP, 2002. p 15-18.
- FIORAVANTI, K. L.; CELINO, J. J.; ROSSI-ALVA, J. C. Isolamento, seleção e identificação de microorganismos degradadores de petróleo e seus derivados em sedimentos de manguezais contaminados. *Cadernos de Geociências*, v.9, n.2, novembro 2012.
- GARRITY, G.; VOS, P.; JONES D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, A. F.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMA, W.B.. Review: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. the Archaea, Cyanobacteria, Phototrophs & Deeply (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition). Springer Science & Business Media, Volume 3. 2011.
- GEORGE M. Garrity. The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Volume 2:., Editor-in Chief. David R. Boone and Richard W. Castenholz, Editors. Springer: New York. 2005.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. *The use of solid media for detection of enzyme production by fungi*. Mycologia 67:597-607. 1979.
- KITANCHAROEN, N. & HATAI, K. - *Some Biochemical Characteristics of Fungi Isolated from Samonid Eggs*. Mycoscience, 39. 1998.
- MACIEL, A. B.; WETLER, R. M. C.; REZENDE, C. E. Prospecção de Bactérias com Potencial para a degradação de compostos de petróleo no sedimento do manguezal do Rio Paraíba do Sul- Rio de Janeiro. V CONFICT – Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica, 2009.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - Os manguezais. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha/manguezais>
- SANTIAGO, A. L. C. M. A.; MOTA, C. M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. *Act. Botânic. Brasileir.*, Recife, v. 20, n. 3, p. 641-647, jul./set, 2006.