

## **Avaliação do potencial proteolítico de bactérias isoladas do solo de Iranduba**

**Evaluation of the proteolytic potential of bacteria isolated from the Iranduba soil**

**Evaluación del potencial proteolítico de bacterias aisladas del suelo de Iranduba**

Recebido: 23/03/2021 | Revisado: 29/03/2021 | Aceito: 30/03/2021 | Publicado: 10/04/2021

### **Vera Lúcia Falcão Sarmento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8639-7437>  
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil  
E-mail: veruscafsciologa@gmail.com

### **Paulo Alexandre Lima Santiago**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>  
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil  
E-mail: psantiago@uea.edu.br

### **Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>  
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil  
E-mail: srhrael@hotmail.com

### **Aldalúcia Macêdo dos Santos Gomes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1932-4350>  
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil  
E-mail: aldalucia.gomes@gmail.com

### **Keila Dayane do Espírito Santo Pereira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1697-3558>  
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil  
E-mail: keila\_dayane@yahoo.com.br

### **Resumo**

As bactérias são grupos de microrganismos que vivem de maneira independente ou em comunidade. São encontrados em diversos tipos de ecossistemas, e constituem o grupo mais numeroso e importante, pois degradam determinados substratos gerando compostos de elevado valor comercial, entre esses substratos, as enzimas como a lipase, amilase e protease, entre outras, são utilizadas em vários processos industriais. As bactérias são consideradas uma fonte atrativa na produção de protease, devido a possibilidade de cultivo em processos fermentativos com tempo reduzido e volumes elevados. O objetivo do presente estudo foi isolar bactérias produtoras de enzimas proteolíticas e avaliar o seu potencial enzimático. Para isto, foram analisadas amostras de solo coletadas do município de Iranduba, localizado no Estado do Amazonas. Dos microrganismos obtidos, foram selecionadas duas bactérias, que foram cultivadas em meio ágar gelatina leite para determinação da atividade proteolítica. De acordo com os resultados obtidos, a determinação da atividade se deu pela formação de halos de degradação em volta das colônias, os quais foram medidos, analisados e representados conforme a classificação de atividade proteolítica. A formação desses halos foi sinônimo de que houve atividade proteolítica, onde as bactérias isoladas produziram enzimas com poder de degradação em relação a proteína presente no leite utilizado no meio de cultura.

**Palavras-chave:** Bactéria; Proteases; Atividade enzimática.

### **Abstract**

Bacteria are groups of microorganisms that live independently or in community. They are found in several types of ecosystems, and constitute the most numerous and important group, as they degrade certain substrates generating compounds of high commercial value, among these substrates, enzymes such as lipase, amylase and protease, among others, are used in various processes industrial. Bacteria are considered an attractive source in the production of protease, due to the possibility of cultivation in fermentation processes with reduced time and high volumes. The aim of the present study was to isolate bacteria that produce proteolytic enzymes and evaluate their enzymatic potential. For this, soil samples collected from the municipality of Iranduba, located in the State of Amazonas, were analyzed. From the microorganisms obtained, two bacteria were selected, which were grown on gelatin milk agar to determine proteolytic activity. According to the results obtained, the activity was determined by the formation of degradation halos around the colonies, which were measured, analyzed and represented according to the classification of proteolytic activity. The formation of these halos was synonymous with the existence of proteolytic activity, where the isolated bacteria produced enzymes with degradation power in relation to the protein present in the milk used in the culture medium.

**Keywords:** Bacteria; Protease; Enzymatic activity.

## Resumen

Las bacterias son grupos de microorganismos que viven de forma independiente o en comunidad. Se encuentran en varios tipos de ecosistemas, y constituyen el grupo más numeroso e importante, ya que degradan ciertos sustratos generando compuestos de alto valor comercial, entre estos sustratos, enzimas como la lipasa, amilasa y proteasa, entre otras, se utilizan en diversos procesos industriales. Las bacterias se consideran una fuente atractiva en la producción de proteasa, debido a la posibilidad de cultivo en procesos de fermentación con tiempos reducidos y altos volúmenes. El objetivo del presente estudio fue aislar bacterias productoras de enzimas proteolíticas y evaluar su potencial enzimático. Para ello, se analizaron muestras de suelo recolectadas del municipio de Iranduba, ubicado en el Estado de Amazonas. De los microorganismos obtenidos se seleccionaron dos bacterias, que se cultivaron en agar gelatina-leche para determinar la actividad proteolítica. De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad se determinó por la formación de halos de degradación alrededor de las colonias, las cuales fueron medidas, analizadas y representadas según la clasificación de actividad proteolítica. La formación de estos halos fue sinónimo de la existencia de actividad proteolítica, donde las bacterias aisladas produjeron enzimas con poder de degradación en relación con la proteína presente en la leche utilizada en el medio de cultivo.

**Palabras clave:** Bacterias; Proteasas; Actividad enzimática.

## 1. Introdução

Os microrganismos pertencem a um grupo heterogêneo de seres que vivem de forma independente ou em comunidades e encontram-se amplamente distribuídos em diversos tipos de ecossistemas (Cardoso; Andreote, 2016). Dentre estes seres, os fungos e as bactérias são aqueles que através de reações químicas de decomposição, participam da manutenção de diversos processos ecológicos. Logo, apresentam um papel fundamental na ciclagem dos nutrientes em ecossistemas aquáticos e terrestres (Thomaz, 2009).

As bactérias constituem o grupo numeroso e provavelmente o mais importante entre os integrantes microbianos do solo. Pois, através da degradação de determinados substratos, podem gerar compostos de elevado valor comercial como as enzimas (Santos, et.al, 2016).

Enzimas são proteínas produzidas por células vivas que promovem e aceleram reações químicas e regulam a maior parte dos processos biológicos. As enzimas são eficientes por serem de origem natural, podem ser recuperadas do meio reacional e atuam em temperaturas relativamente baixas, tornando-as vantajosas no processo de utilização. As enzimas podem ser divididas em seis classes conforme o tipo de reação que catalisam conforme apresentado na Tabela 1 (Orlandelli, 2012).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas.

Classes	Tipos de Reação química catalisada	Exemplos
Oxidoreductase	Oxidação-redução, na qual oxigênio e hidrogênio são adquiridos ou perdidos	Citocromo oxidase, lactato desidrogenase
Transferase	Transferência de grupos funcionais, como um grupo amino, grupo acetil ou grupo fosfato	Acetato-cinase, alanina deaminase
Hidrolase	Hidrólise de compostos	Lipase, sacarase
Liase	Remoção de grupos de átomos sem hidrólise	Oxalato descarboxilase, isocitrato liase
Isomerase	Rearranjo de átomos dentro de uma molécula	Glicose fosfato isomerase, alanina racemase
Ligase	União de duas moléculas (utilizando a energia geralmente derivada da quebra do ATP)	Acetil-CoA sintase, DNA-ligase

Fonte: Autores.

As enzimas são utilizadas em vários processos, como na produção de pães, dando mais volume ao produto e proporcionar melhor granulação e textura ao longo do preparo (BON; et.al, 2008). Na produção de laticínios, as enzimas são utilizadas para promover a coagulação do leite produzindo diversos tipos de queijo. Estes compostos são utilizados ainda no desenvolvimento de produtos para as indústrias de cosméticos, bebidas, têxtil, celulose e papel (Mussato, Fernandes, Milagres, 2014).

Das diversas classes de enzimas existentes, umas das mais exploradas são as proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos de uma proteína através da clivagem proteolítica (Tortora, 2017), e constituem um dos grupos de elevada importância comercial, devido sua utilização em diversos setores industriais como: o de produtos de limpeza, que usam as amilases, proteases, lipases e celulasas como aditivos em suas formulações. A atuação conjunta desses compostos, chamam atenção por suas combinações agirem removendo compostos orgânicos através da digestão. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos (Mussato, Fernandes e Milagres, 2014). Essas enzimas também são aplicadas na preparação de cervejas, óleos vegetais, em processos que utilizam o couro, dentre outros, proporcionando produtos finais com características específicas (Silva, 2013).

Existem diversas aplicações para as proteases, dentre elas no setor acadêmico de pesquisa na preparação de protoplastos, transformação de leveduras para obtenção de produtos de DNA recombinante, estudos sobre a composição e formação da parede celular, digestão de proteínas da parede celular de leveduras, obtenção de extrato de levedura, tratamento de ração animal e no tratamento de doenças (Fleuri & Sato, 2005).

Quanto as aplicações industriais, as proteases são utilizadas para a produção de detergentes sendo vantajosas por serem estáveis em temperaturas e pH elevados. São utilizadas ainda no como medicamentos, no tratamento de couro, produção de alimentos e no tratamento de efluentes (Nascimento & Martins, 2006; Ohmiya, Tanimura, Yashi, & Shimizu, 1979).

Tais enzimas proteolíticas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e microrganismos, sendo que, aquelas produzidas por plantas e de origem animal, dependem de um processo de obtenção mais demorado por dispor de área para cultivo e condições climáticas e também da disponibilidade de animais para o abate. Já os microrganismos representam uma interessante fonte de proteases por sua grande diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética e é de rápido crescimento em curto prazo, necessário para o seu cultivo (Giongo, 2006).

O presente estudo teve como objetivo, avaliar o potencial proteolítico de bactérias obtidas a partir do isolamento, purificação e conservação dos microorganismos do solo do igarapé do Iranduba localizado no Estado do Amazonas.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Coleta, Isolamento, purificação e conservação de bactérias do solo**

A amostra de solo foi coletada na comunidade São Sebastião localizada no município de Iranduba, e transportado para o laboratório multidisciplinar da Escola Superior Batista do Amazonas – ESBAM. No laboratório, foi diluído 1g de solo em 10 ml de água destilada autoclavada em seguida inoculou-se 50µL da suspensão em meio líquido.

Após a diluição, uma alíquota de 100 µL da amostra diluída foi inoculada em três placas de petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com Amoxicilina (c = 50mg/ml). Com o auxílio de um swab, a amostra foi espalhada. Após isto, as placas foram incubadas à 28 °C. O experimento ocorreu ao longo de 15 dias e conforme o aparecimento das linhagens nas placas de isolamento, e realizou-se o repique para novas placas contendo BDA.

Quando necessário, foi realizado o procedimento de repique tripontual para purificar as linhagens. Após a purificação, todas as linhagens foram conservadas em microtubos contendo glicerol 20% e armazenadas em geladeira.

## 2.2 Avaliação da atividade proteolítica em meio sólido

As linhagens obtidas, foram reativadas em meio BDA durante sete dias a 28 °C. Em seguida, a atividade proteolítica foi determinada utilizando-se o meio ágar-gelatina-leite através da técnica de bloco de gelose. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata sendo considerado positivo quando foi observado o aparecimento de um halo translúcido ao redor do bolo de gelose. A atividade enzimática foi determinada pela medição do halo em milímetros (Teixeira, 1997), onde a atividade enzimática (Pz) foi medida pelo diâmetro da colônia sobre o diâmetro do halo, representada pela expressão abaixo.

$$Pz = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro do halo}}$$

Quanto menor o valor de (Pz), maior será atividade enzimática, sendo os resultados representados pelas classificações a seguir (Price et.al, 1982; Santos et.al, 2009).

**Tabela 2.** Classificação de atividade enzimática.

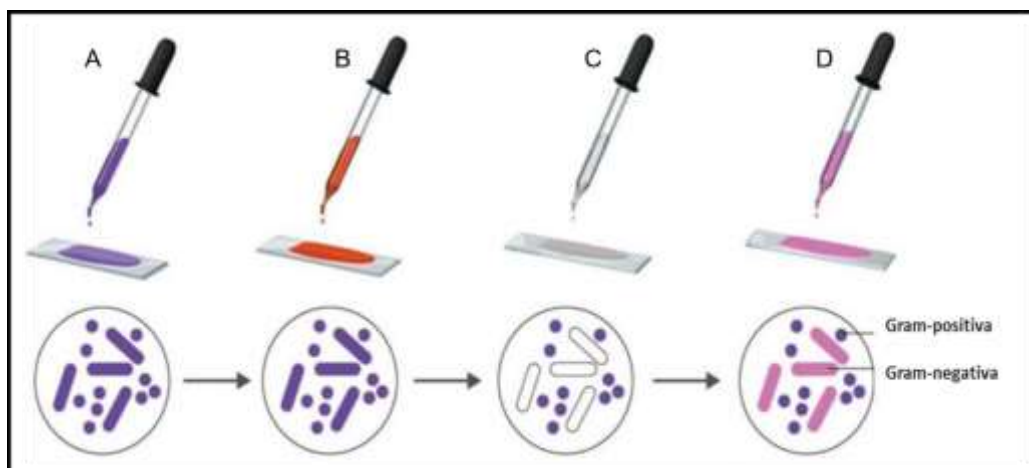
1	Quando (Pz) = 1,0 (ausência de atividade)
2	Quando $0,64 < (Pz) > 1,0$ (atividade enzimática positiva)
3	Quando (Pz) $\leq 0,64$ (atividade enzimática fortemente positiva)

Fonte: Autores.

## 2.3 Coloração de Gram

A cultura bactéria utilizada no item 2.2 foi submetida a coloração de gram. Para isso, retirou-se um fragmento da cultura bacteriana com o auxílio de uma alça de platina e através de movimentos de rotação a cultura foi afixada em uma lâmina de microscópio. A fixação da amostra foi realizada com o auxílio de bico de Bunsen. Em seguida, a amostra fixada foi submetida aos seguintes reagentes cristal violeta, lugol, álcool-acetoba e fucsina. De acordo com a cor obtida ao fim do procedimento, as linhagens podem ser classificadas em Gram-positivas (roxo) e Gram-negativas (rosa). O esquema do procedimento de coloração de gram está apresentado na Figura 1 (Colco, 2005).

**Figura 1.** Procedimento de coloração de Gram. A – Cristal violeta, B – Lugol, C – Álcool-Acetona e D – Fucsina (MARTINS et al., 2001 adaptado)



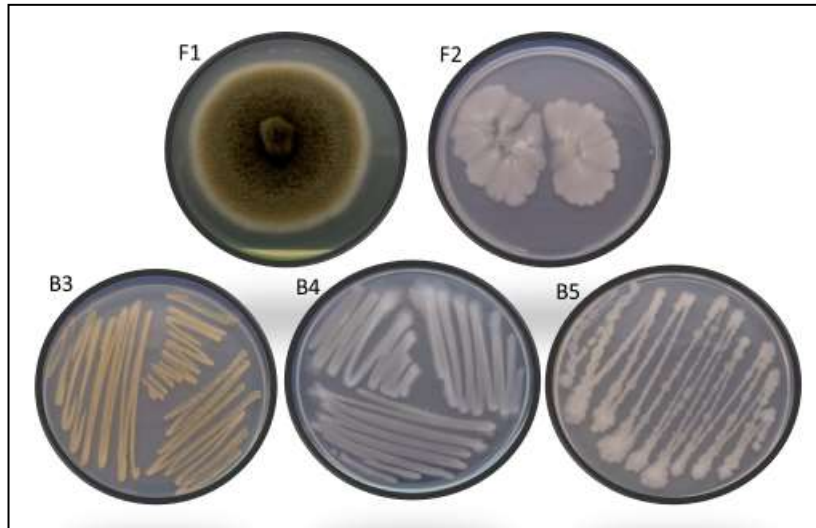
Fonte: Autores.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Isolamento e purificação dos microrganismos

A partir do isolamento dos microrganismos associados ao solo, foram obtidos 2 fungos e 3 bactérias. Todas as linhagens foram preservadas e encontram-se armazenadas em geladeira à temperatura de 8 °C.

**Figura 2.** Microrganismos obtidos a partir do isolamento de amostra de solo

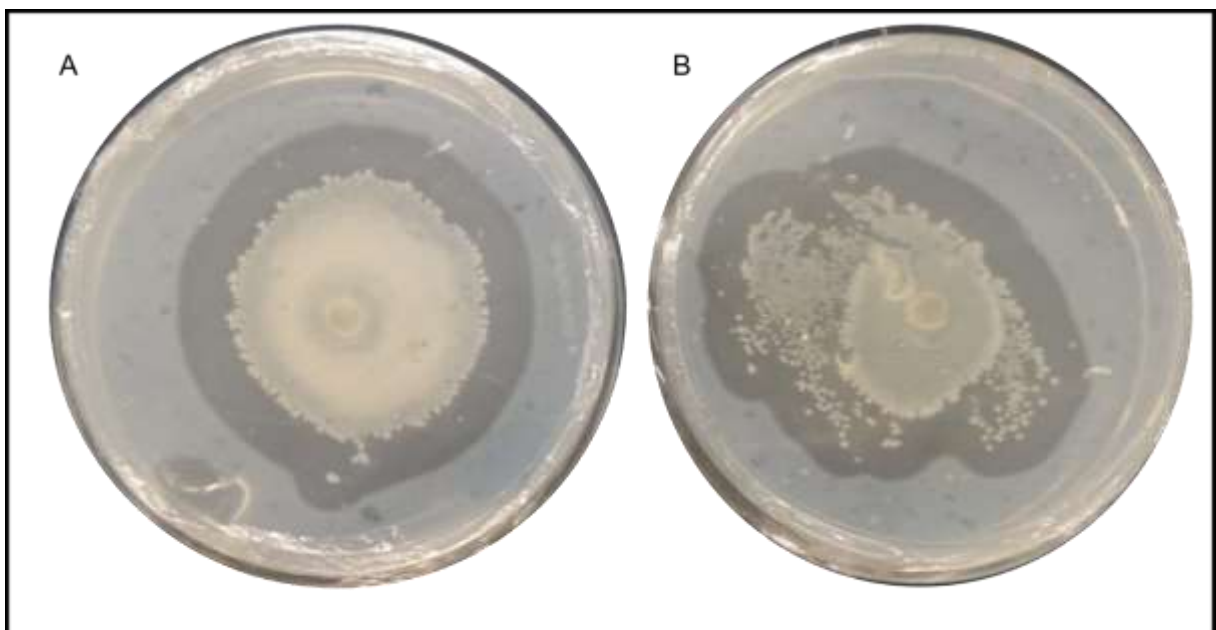


Fonte: Autores.

#### 3.2 Avaliação do potencial proteolítico

O ensaio de determinação proteolítica, foi realizado segundo a metodologia descrita por Ichikawa, Ishikura e Ozaki (1971), que ocorre pela difusão em ágar utilizando um bloco de gelose. O resultado da avaliação proteolítica para as bactérias selecionadas, pode ser observado na figura 3. Das três bactérias utilizadas neste estudo, apenas duas apresentaram atividade.

**Figura 3.** Avaliação proteolítica. A – Bactéria 2 e B – Bactéria 3.



Fonte: Autores.

Houve a formação de halo de degradação no meio ágar leite, onde a atividade enzimática (Pz) foi medida conforme o item 2.2, e representada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Atividade enzimática em meio Ágar gelatina/leite.

Bactéria	Dc (mm)	Dh (mm)	Pz
<b>B3</b>	45	70	0,642
<b>B4</b>	28	65	0,430

Dc= diâmetro da colônia, Dh= diâmetro do halo, Pz= Atividade enzimática. Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 2 do item 3.2, a bactéria 2 obteve classificação 2, apresentando resultado positivo para atividade enzimática. E a bactéria 3 obteve classificação 3, sendo fortemente positiva para atividade enzimática.

Na pesquisa de Lima, 2013 sobre proteases com atividade colagenolíticas produzidas por *Bacillus ssp.* de solo Amazônico, foi utilizada a mesma técnica do bloco de gelose em meio Ágar gelatina leite para determinação de atividade proteolítica, onde houve formação de halos translúcidos que foram medidos em milímetros.

Este método também foi utilizado por Santos et.al, 2015, na pesquisa de produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico. Foram isoladas 30 bactérias originadas do solo contaminado por petróleo. No meio ágar gelatina leite, houve formação de halos, mostrando que a atividade proteolítica apresentou variação de 0,015 a 1,3. Considerando os valores de Pz, os pesquisadores concluíram 46,7% dos isolados com alta atividade proteolítica e nos demais 50%, a atividade foi baixa ou ausente em 3,33%.

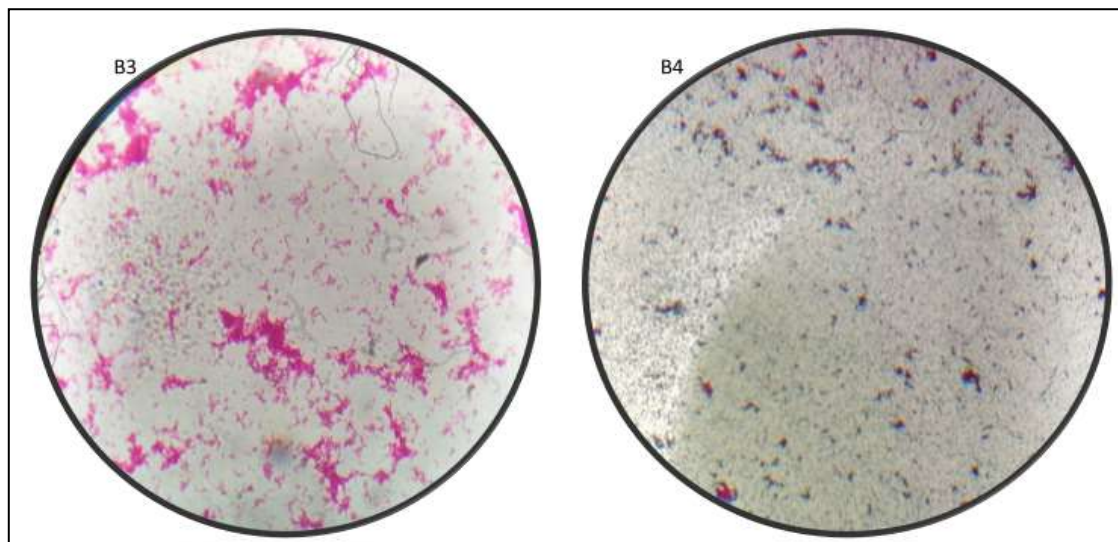
Com base nas análises da pesquisa e artigos comparativos, confirmou-se que o halo translúcido que se formou ao redor da colônia, aponta que houve degradação da proteína presente no meio de cultura ágar gelatina leite. Isso ocorreu devido ação decompositora da enzima produzida pela bactéria de origem do solo. (Arcuri, 2007). Dessa forma, Lima, 2013 e Santos et al., 2015, corroboram com o presente artigo em relação a presença de atividade proteolítica das bactérias obtidas do solo amazônico.

### 3.3 Coloração de Gram

Conforme descrito no item 2.3, a bactéria 3 apresentou coloração rosa com estruturas de bacilo, sendo portanto uma bactéria Gram negativa. Para a bactéria 4, a coloração observada foi o violeta, sendo assim Gram positiva.



**Figura 4.** Bactéria 3 Gram Negativa e Bactéria 4 Gram Positiva.



Fonte: Autores.

#### 4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que as amostras de microrganismos provenientes do solo do município de Iranduba, se mostraram eficientes para a obtenção de bactérias produtoras de proteases. As bactérias testadas apresentaram atividade, confirmando o potencial proteolítico da bactéria de origem natural. Quanto ao método de coloração de Gram, obteve-se um resultado positivo e outro negativo, para cada uma das bactérias analisadas.

#### Referências

- Arcuri, E. F., Silva, P. D. L., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Lange, C. C., & Magalhães, M. M. A. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado.
- Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., & Corvo, M. L. (2008). *Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado*. Interciência.
- Cardoso, E. J. B. N., & Andreote, F. D. (2016). *Microbiologia do solo*. ESALQ.
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H. (2005). *Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas*. Química Nova.
- Giongo, J. L. (2006). Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.
- Martins, C. R. F., Ferreira, J. A. P., Siqueira, L. F. G., & Ferreira, L. A. P. (2001). Técnica de coloração de GRAM. Ministério da saúde. Brasília.
- Mussatto, S., Fernandes, M., & Milagres, A. M. F. (2014). *Ciência Hoje*. 41(242).
- Nascimento, W. C., & Martins, M. L. (2006). Studies on stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-9.
- Ohmiya, K., Tanimura, S., Yashi, T. K., & Shimizu, S. (1979). Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. *Journal of Food Science*.
- Orlandelli, R. C., Specian, V., Felber, A. C., & Alencar, J. (2012). *Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações*.
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, I. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, *Sabouraudia*. 20, 7-14.
- Santos, J. G., Filho, R. F. C., & Teixeira, M. F. S. (2016). Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico. Manaus, AM.
- Santos, J. G., Filho, R. F., & Teixeira, M. F. S. (2015). Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico.
- Santos, J. G., Cruz Filho, R. F., Lima, L. A., Fernandes, O. C. C., Teixeira, M. F. S. & Porto, A. L. F. (2009). Produção de proteases alcalinas por *Bacillus* sp. solado do solo contendo resíduos industriais de couro. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos.
- Silva, E. T. (2013). Estabilização de proteases para aplicação tecnológica.

Thomaz, S. M. (2009). *O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos*. Nupélia.

Tortora, G. J., Funk, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiologia*. (12a ed.), Artmed.