



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR**

**LUCAS SILVA BRITO**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO  
TECIDO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***

**JOÃO PESSOA - PB**

**2020**

**LUCAS SILVA BRITO**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO  
TECIDO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para obtenção  
do grau de Bacharel em Biotecnologia pela  
Universidade Federal da Paraíba.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Krystyna Gorlach Lira

**Coorientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa

**JOÃO PESSOA - PB**

**2020**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B862p Brito, Lucas Silva.

Produção de enzimas extracelulares por bactérias  
isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* /  
Lucas Silva Brito. - João Pessoa, 2020.  
68 f. : il.

Orientação: Krystyna Gorlach-Lira.

Coorientação: Adna Cristina Barbosa de Sousa.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Bactérias halotolerantes. 2. Enzimas extracelulares.  
3. *Palythoa caribaeorum*. I. Gorlach-Lira, Krystyna. II.  
Sousa, Adna Cristina Barbosa de. III. Título.

UFPB/BC

### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezesseis dias do mês de março de 2020, às 16:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Krystyna Gorlach Lira (CCEN/UFPB) e composta pelo(a)s avaliadore(a)s: 1. Orientadora Prof(a). Dr(a). Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof(a). Dr(a). Andréa de Farias Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB), o(a) discente Lucas Silva Brito, matrícula 2016025523, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum*”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Krystyna Gorlach Lira, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelo(a)s demais avaliadore(a)s e pelo(a) discente.

Krystyna Gorlach Lira  
Presidente da Banca Examinadora

Andréa Farias de Almeida  
Avaliador(a) 2

Adna Cristina B. de Sousa  
Orientador(a) e Avaliador(a) 1

Lucas Silva Brito  
Discente

---

João Pessoa/PB, 16 de março de 2020.

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais por todo o suporte durante toda a minha trajetória no curso e pela confiança depositada em mim.

Agradeço à minha orientadora prof<sup>a</sup> Krystyna Lira por me permitir fazer parte do seu laboratório e por todos os seus ensinamentos durante esses dois anos de parceria, no qual me ajudou no meu desenvolvimento como profissional e a construir um alicerce forte no conhecimento científico.

Agradeço aos meus melhores amigos do grupo Biomaníacos (Will, Ka, Eve, Juba, Jacke, Rena e Toni) que estão comigo desde o início da minha jornada na universidade, me apoiando e dando suporte em todos os momentos em que precisei, sempre me ensinando coisas novas e sempre torcendo para o meu sucesso.

Agradeço aos demais amigos que adquiri no curso de Biotecnologia, e em diversas outras experiências em que tive a oportunidade de criar novos laços como a AIESEC, meu primeiro curso, durante os estágios e durante toda a minha jornada desde que vim a João Pessoa.

Agradeço ao BIOMICRO, o laboratório que me acolheu desde o meu 4º período, e aos seus integrantes e meus amigos Iasmin, Jalcinês, Rádamis, Samuel, Fernanda, Thiago e Vanessa, no qual tive a oportunidade de aprender muito e a me desenvolver profissionalmente.

Agradeço a alguns professores do corpo do docente do curso de Biotecnologia que foram capazes de transmitir seus conhecimentos sabiamente e de forma impecável, demonstrando grande excelência.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e torceram para o meu sucesso durante todo o meu caminho até aqui.

## RESUMO

A bioprospecção de novas enzimas com características diferenciadas como a estabilidade em diferentes faixas de pH, salinidade e temperatura são muito promissoras, principalmente para aplicação em vários processos industriais. O ambiente marinho apresenta uma vasta biodiversidade ainda pouco explorada e os organismos marinhos tem sido promissórios como novas fontes de enzimas. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar as bactérias isoladas do tecido necrosado do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes de Carapibus – PB. Foi avaliado o padrão de crescimento de isolados sob diferentes concentrações de NaCl e a produção de proteases, celulasas e lipases em diferentes condições de cultivo. Os isolados de bactérias foram submetidos a uma extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene de RNAr 16S e análise filogenética. A determinação do padrão de crescimento foi realizado em caldo marinho Zobell 2216 nas concentrações de 2 a 20% (m/v) de NaCl por 7 dias a 37° C. Para analisar a produção de enzimas extracelulares, utilizou-se meios sólidos contendo substratos específicos: gelatina, carboximetilcelulose (CMC) e óleo vegetal residual para detecção de proteases, celulasas e lipases, respectivamente. O isolado mais ativo na produção de celulasas foi submetido a análise do efeito de pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), temperatura (37 e 50 °C) e salinidade (2%, 5% e 7,5% de NaCl) na atividade enzimática. A análise filogenética revelou que os isolados pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. Com relação ao crescimento de bactérias em meio com diferentes concentrações de NaCl, um isolado foi capaz de crescer até 10% de NaCl, sete isolados cresceram até 7,5% de NaCl, quatro até 5% de NaCl e um até 4% de NaCl. Constatou-se que todos os isolados produziram pelo menos uma das enzimas avaliadas, sendo que 46,1% foram produtores de proteases, 61,5% de celulasas e 76,9% de lipases. *Bacillus subtilis* NC8 foi o único isolado capaz de produzir todas as enzimas analisadas, já *Pseudomonas stutzeri* NC2 foi, dentre todos, o isolado que apresentou o maior índice enzimático (celulase - 14,15). As melhores condições para produção de celulase por *P. stutzeri* NC2 foram pH 8,0, temperatura de 37 °C e a concentração de NaCl de 2%. Os resultados obtidos indicam que alguns isolados de bactérias analisados apresentam potencial de exploração para produção de enzimas extracelulares, principalmente as celulasas.

**Palavras-chave:** Bactérias halotolerantes; Enzimas extracelulares; *Palythoa caribaeorum*.

# PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENZYMES BY BACTERIA ISOLATED FROM THE ZOANTIDE TISSUE *Palythoa caribaeorum*

## ABSTRACT

The bioprospecting of new enzymes with different characteristics, such as stability in different pH ranges, salinity and temperature, are very promising, mainly for application in various industrial processes. The marine environment has a vast biodiversity that is still little explored and marine organisms have been promising as new sources of enzymes. Thus, the objective of the present work was to identify and characterize the bacterial isolates from the necrotic tissue of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from the reefs of Carapibus - PB. The growth of individuals under different levels of NaCl and the production of proteases, cellulases and lipases under different culture conditions were evaluated. The bacterial isolates were submitted to an extraction of genomic DNA, amplification and sequencing of the RNAr 16S gene and phylogenetic analysis. The determination of the growth pattern was carried out in marine ZOBELL 2216, at the levels of 2 to 20% (m / v) of NaCl for 7 days at 37 ° C. To analyze the production of extracellular enzymes, were used solid mediums containing the specific substrates: gelatin, carboxymethylcellulose (CMC) and residual vegetable oil for the detection of proteases, cellulases and lipases, respectively. The most active isolate in the production of cellulases was subjected to an analysis of the effect of pH (5.0; 6.0; 7.0 and 8.0), temperature (37 and 50 °C) and salinity (2%, 5% and 7.5% NaCl) in the enzymatic activity. The phylogenetic analysis revealed that the isolates belong to the genera *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* and *Pseudomonas*. Regarding the growth of bacteria in medium with different concentrations of NaCl, one isolate was able to grow up to 10% NaCl, seven growing up to 7.5% NaCl, four up to 5% NaCl and one up to 4% NaCl. It was identified that all the isolates produced at least one of the evaluated enzymes, which 46.1% produced protease, 61.5% cellulases and 76.9% lipases. *Bacillus subtilis* NC8 was the only one capable of producing all the enzymes analyzed, whereas *Pseudomonas stutzeri* NC2 were, among all, the isolate that had the highest enzyme index (cellulase - 14,15). The best conditions for cellulase production by *P. stutzeri* NC2 were pH 8.0, temperature of 37 °C and NaCl concentration of 2%. The results obtained demonstrated that some of the analyzed bacterial isolates had potential to be explored for extracellular enzymes, mainly cellulases.

**Keywords:** Halotolerant bacteria; Extracellular enzymes; *Palythoa caribaeorum*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recifes de corais em Carapibus -PB (A) e o zoantídeo <i>P. caribaeorum</i> (B)...	16
Figura 2. <i>P. caribaeorum</i> sadio (A) e com a ferida necrosada (B) nos recifes de Carapibus, Paraíba .....	27
Figura 3. Árvore filogenética de bactérias isoladas do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i> e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise <i>neighbour-joining</i> e o modelo Kimura 2- parâmetros.....	37
Figura 4. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. N1 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	39
Figura 5. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. NC1 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	39
Figura 6. Curva de crescimento do isolado <i>P. stutzeri</i> NC2 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	40
Figura 7. Curva de crescimento do isolado <i>P. stutzeri</i> NC5 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	40
Figura 8. Curva de crescimento do isolado <i>Exiguobacterium</i> sp. NC6 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	41
Figura 9. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. NC7 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	41
Figura 10. Curva de crescimento do isolado <i>B. subtilis</i> NC8 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	42
Figura 11. Curva de crescimento do isolado <i>S. epidermidis</i> N2 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	42
Figura 12. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. NC3 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	43
Figura 13. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. NC4 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	43
Figura 14. Curva de crescimento do isolado <i>A. koreensis</i> NC10 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	44
Figura 15. Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. N5 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	44
Figura 16. Curva de crescimento do isolado <i>A. koreensis</i> NC9 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.....	45

Figura 17. Os halos de hidrólise de gelatina dos isolados de bactérias positivas para protease: <i>Bacillus</i> sp. NC3, NC4, NC7 e N5, <i>B. subtilis</i> NC8 e <i>Exiguobacterium</i> sp. NC6 .....	47
Figura 18. Os halos de hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) dos isolados de bactérias ativas para celulase: <i>Bacillus</i> sp. NC1 e N1 e <i>P. stutzeri</i> NC2 e NC5 .....	50
Figura 19. Isolados de bactérias ativos na produção de lipases: <i>S. epidermidis</i> N2, <i>A. koreensis</i> NC9, <i>P. stutzeri</i> NC5 e <i>Bacillus</i> sp. NC3 e NC7 .....	52
Figura 20. Efeito do pH e temperatura na atividade celulolítica do sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo do isolado <i>P. stutzeri</i> NC2 .....	54
Figura 21. Halos de hidrólise de CMC após 24h de incubação do sobrenadante livre de células ( <i>P. stutzeri</i> NC2) a 37°C em diferentes pH .....	54
Figura 22. Halos de hidrólise de CMC após 24h de incubação do sobrenadante livre de células ( <i>P. stutzeri</i> NC2) a 50°C em diferentes pH .....	56
Figura 23. Halos de hidrólise após 24h de incubação do sobrenadante livre de células ( <i>P. stutzeri</i> NC2) a 37°C em pH 8,0 em diferentes concentrações de NaCl.....	57
Figura 24. Efeito da salinidade na atividade celulolítica do sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo do isolado <i>P. stutzeri</i> NC2 .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das bactérias isoladas do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	35
Tabela 2. Identificação dos isolados de bactérias do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i> baseada nas sequências parciais de RNAr 16S e nos resultados do BLASTn .....	36
Tabela 3. Atividade enzimática dos isolados estimada pelo valor do índice enzimático (protease e celulase) ou presença da fluorescência (lipase) .....	49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 ZOANTÍDEOS: <i>Palythoa Caribaeorum</i> .....	16
2.2 BACTÉRIAS MARINHAS .....	17
2.3 ENZIMAS EXTRACELULARES DE ORIGEM MICROBIANA.....	19
2.3.1 CELULASES.....	20
2.3.2 PROTEASES .....	22
2.3.3 LIPASES.....	23
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 MICRORGANISMOS .....	26
4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS .....	27
4.3 TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....	29
DE NaCl.....	29
4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS .....	29
4.4.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	30
4.4.2 ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	30
4.4.3 ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	31
4.4.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO .....	32
4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DO ISOLADO <i>P. stutzeri</i> NC2 .....	33
4.5.1 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	33

4.5.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
5.1 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS .....	35
5.2 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	38
5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS.....	47
5.3.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	47
5.3.2 ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	50
5.3.3 ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	51
5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DO ISOLADO <i>P. stutzeri</i> NC2 .....	53
5.4.1 INFLUÊNCIA DO pH, TEMPERATURA E SALINIDADE NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	53
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os recifes de corais apresentam uma variedade de organismos e interações entre eles, dos quais podem ser obtidos uma grande diversidade de moléculas quimicamente complexas e potencialmente ativas, que atuam de maneira distinta na manutenção e sobrevivência desses organismos. A bioprospecção de novas moléculas a partir de isolados marinhos vem sendo bastante explorada nos últimos anos por conta das características promissoras que estas moléculas apresentam, principalmente no que diz respeito a produção de enzimas. Devido a busca constante das indústrias por novas enzimas que apresentem características únicas e sejam melhores que as do mercado, a bioprospecção se torna uma ferramenta importante, pois procura suprir as necessidades atuais, aprimorar os processos industriais e de certo modo realizar de forma mais sustentável diversos processos realizados na indústria.

Diversos grupos de microrganismos apresentam complexas relações com os corais, atuando como simbioses, como por exemplo, as zooxantelas, oportunistas ou patógenos. O zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti 1861) é um coral bem característico estando presente em todo litoral brasileiro. O perfil de bactérias presente nesse organismo pode variar conforme alguns fatores como temperatura e ações antrópicas, que podem ocasionar o surgimento de doenças, como branqueamento ou necrose. As bactérias desse zoantídeo são muito pouco estudadas, com relação a diversidade e propriedades fisiológicas. O tecido dos corais é rico em proteínas e lipídeos, apresentando ainda vários tipos de microrganismos, com algas simbioses zooxantelas constituídas por polissacarídeos, tais como celulose. Esse ambiente é promissor para bioprospecção de microrganismos ativos na produção de enzimas extracelulares.

As enzimas podem ser obtidas através de vários organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos, no entanto devido à facilidade de produção e abundância, as enzimas mais estudadas e utilizadas industrialmente são obtidas de microrganismos. A obtenção de tais enzimas a partir de fontes microbianas vêm recebendo maior visibilidade da indústria por causa de suas interessantes características, tais como menor custo de produção, estabilidade e alta especificidade ao substrato.

Além disso, muitas das características identificadas em bactérias marinhas como halotolerância e termoestabilidade estão atreladas às características do local ao qual a bactéria foi isolada, ou seja, bactérias isoladas de ambiente marinho de certa forma apresentam por si só uma maquinaria enzimática adequadamente adaptada para tal qual

o ambiente em que ela se encontra. Ademais, a presença de tais características agrega maior valor a essas enzimas e a esses isolados, e por isso há um interesse crescente por parte dos pesquisadores na bioprospecção de isolados marinhos.

Portanto o presente trabalho teve como objetivo verificar a produção de enzimas extracelulares (celulases, lipases e proteases) através da bioprospecção de isolados provenientes do tecido necrosado do zoantídeo *P. caribaeorum* dos recifes de corais da Praia de Carapibus, Conde - PB, assim como verificar o perfil halotolerante ou halófilo desses isolados.

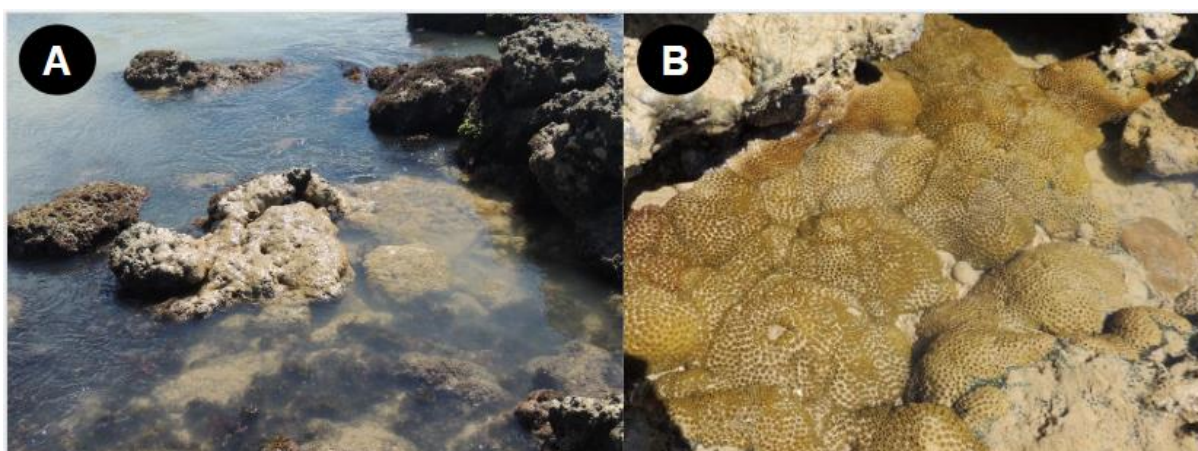
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ZOANTÍDEOS: *Palythoa Caribaeorum*

Os corais são organismos exclusivamente marinhos, sésseis e bentônicos que se apresentam como polipoides compondo grande parte dos recifes de corais, encontrados abundantemente em áreas tropicais do Indo-Pacífico dos quais podem se estender por quilômetros (SOARES et al., 2006; PECHENIK, 2016). Os corais podem apresentar esqueletos internos de carbonato de cálcio (corais duros) ou ausência do mesmo (corais moles).

Os zoantídeos, chamados de corais moles, são cnidários pertencentes a ordem Zoantharia, podendo se apresentar como formas solitárias ou coloniais. O zoantídeo *P. caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Figura 1) é um antozoário desprovido de esqueleto carbonático, cuja os pólipos estão conectados por um espesso tecido chamado cenênquima, capaz de agregar partículas a sua superfície. A espécie é predominantemente encontrada em regiões costeira mais rasas com até 15 m de profundidade formando um tapete capaz de permanecer submerso, e também sob condições de maré baixa, através da produção de um muco viscoso que serve como proteção frente a dessecação. Ademais os corais do gênero *Palythoa* são ilustradas na literatura como produtores de uma toxina potente, a palitoxina (SOARES et al., 2006; CAMPOS, 2011).

Figura 1. Recifes de corais em Carapibus -PB (A) e o zoantídeo *P. caribaeorum* (B)



Fonte: GORLACH-LIRA, 2014.



A distribuição geográfica desse zoantídeo se dá em todo o litoral brasileiro desde o estado do Ceará até Santa Catarina, podendo ser encontrado também nos recifes do Caribe. Apresentam uma coloração marrom, marrom claro ou bronze devido a relação simbiote com zooxantelas, nome dado as microalgas unicelulares do gênero *Symbiodinium* (dinoflagelados). O *P. caribaeorum* é um coral zooxantelado, visto que este estabelece simbiose com zooxantelas localizadas em um compartimento intracelular denominado de simbiossoma, onde esses organismos residem “enclausuradas” no interior das células da endoderme de corais (CAMPOS, 2011; PECHENIK, 2016).

A interação entre os zoantídeos e microrganismos promovem inúmeros benefícios para ambos os organismos. A zooxantelas auxiliam na conservação e reciclagem de nutrientes essenciais e contribuem para o aumento das taxas de calcificação do coral, e estas, se beneficiam com a proteção, otimização do acesso à luz, e ainda tem acesso a compostos provenientes do metabolismo do hospedeiro. As bactérias que compõe a microflora dos corais também desempenham um papel importante na manutenção de saúde coral, visto que também podem auxiliar na reciclagem de diversos nutrientes e, além do mais atuar como agentes protetores frente a alguns patógenos (PECHENIK, 2016; PEREIRA et al., 2017).

Existem poucos dados sobre a doença necrosante que acomete os zoantídeos em recifes costeiros do nordeste do Brasil. A doença se caracteriza pelo surgimento de uma ferida que rapidamente se espalha decompondo o tecido, o qual apresenta coloração escura e um forte odor fétido (AMORIM et al., 2012). Acosta et al. (2001) descreveram uma doença necrosante acometendo *P. caribaeorum* do litoral norte do Estado de São Paulo, em Angra dos Reis (Rio de Janeiro) e na cidade do Recife (Pernambuco).

## **2.2 BACTÉRIAS MARINHAS**

O ambiente marinho apresenta uma grande diversidade de organismos como, animais, plantas, algas, bactérias, fungos e etc. Esse ecossistema é extremamente complexo e ainda pouco conhecido quando comparado ao terrestre, considerando-se que os oceanos constituem 71% da superfície da Terra (MATOS, 2012).

O organismo hospedeiro e toda a sua microbiota simbiótica forma um holobionte, apresentando as comunidades microbianas muito complexas, as quais interagem dinamicamente entre-se e o hospedeiro. O desenvolvimento de estratégias e mecanismos

que permitem o manejo da vida desses seres nesses ambientes é algo muito importante principalmente para as comunidades microbianas (PITA et al., 2018).

Muitos organismos marinhos vivem em relações simbióticas com microrganismos como esponjas e recifes de corais. Os microrganismos associados a esses organismos podem desempenhar um papel importante na ciclagem de nutrientes, degradação de algum possível xenobiótico e defesa contra patógenos através da produção de compostos antimicrobianos por exemplo (PEREIRA et al., 2017).

Melo, (2017) identificou nos recifes costeiros que, cerca de 67% dos isolados presentes no muco de *P. caribaeorum* pertenciam ao filo Firmicutes, seguido de Actinobacteria e Proteobacteria. Já Paulino e colaboradores (2017), identificaram que a maior parte dos isolados pertenciam ao filo Proteobacteria (57,4%) seguido de outros filios como Actinobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi. Essas variações no perfil de bactérias que compõe a microbiota de corais são comuns não só por fatores como o ecossistema no qual ele está inserido, nas condições climáticas, ações antropológicas ou espécie, mas está atrelado também a qual parte do coral está sendo analisado (muco ou tecido) (CARLOS et al., 2013; PEREIRA et al., 2017).

O estudo realizado por Pereira e colaboradores (2017), avaliou a diversidade de bactérias em diferentes corais brasileiros: *P. caribaeorum*, *Mussismilia hispida*, *Tubastraea coccinea* e *Madracis decactis*. Sob a influência de duas estações diferentes (verão e inverno) foi identificado uma variação do perfil de bactérias encontradas em diferentes ambientes (muco, sedimento e a água ao redor do coral) nos corais analisados. As amostras do muco apresentaram uma maior diversidade de espécies bacterianas quando comparado a amostras do sedimento e da água dos recifes. A estação também foi um fator determinante para composição taxonômica das comunidades bacterianas presente nos recifes de corais. Dentre os isolados, os gêneros *Vibrio* e *Bacillus* estavam presentes nos recifes de corais em maior quantidade no inverno, quando comparado ao verão.

Estudos relacionados a microbiota presente no mesmo zoantídeo *P. caribaeorum* sadio e necrosado demonstram uma variação no perfil de bactérias, no entanto, quase não existem dados sobre a microbiota de *P. caribaeorum* que apresentam necrose. Silva (2015) relatou que 63,2% dos isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum* foram do gênero *Bacillus*, dentre eles *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus* e *B. aerius*, e cerca de 27,9% dos isolados identificados pertenciam ao gênero *Vibrio*. Além disso, ao analisar o perfil de bactérias entre os dois tecidos (sadio e

necrosado) foram identificados que o tecido necrosado apresentou um número maior de isolados do gênero *Vibrio* (16) em relação ao tecido sadio (3). Já o gênero *Bacillus* foi encontrado em maior quantidade no tecido sadio (27) que no tecido necrosado (17).

Atualmente, conforme alguns estudos, acredita-se que os corais apresentam um microbioma base, ou seja, um grupo de bactérias essenciais comum a maioria, senão, a todas as espécies, no qual exercem um papel essencial para a sua sobrevivência no ambiente. Ainda assim, o entendimento e como toda essa interação acontece é complexa, pois a grande diversidade de bactérias presentes no microbioma de corais dificulta a identificação de espécies que desempenham papéis funcionais e essenciais na sobrevivência do mesmo. A presença em comum de bactérias em um mesmo organismo sob diferentes ambientes reforça a ideia da existência de parcerias consistentes entre bactérias e corais (HERNANDEZ-AGREDA et al., 2016; DUNPHY et al., 2019).

### **2.3 ENZIMAS EXTRACELULARES DE ORIGEM MICROBIANA**

As enzimas são moléculas que atuam de forma a acelerar reações químicas, como catalisadores, isso ocorre por meio da redução da energia de ativação necessária para que a reação se proceda, permitindo com que esta aconteça mais rapidamente (NELSON, 2014). As indústrias as utilizam em diversos processos buscando sempre aprimorá-los e também garantir uma melhor qualidade ao produto final. As enzimas podem ser obtidas através de três fontes: animal, vegetal e microbiana, dentre os quais, as de origem microbiana são mais utilizadas devido a algumas vantagens como produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de apresentar um elevado rendimento na produção. Ainda assim, as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais são usadas (MONTEIRO & SILVA, 2009).

As celulasas, juntamente com proteases e lipases, são responsáveis por uma participação significativa no mercado global de enzimas. As proteases microbianas são aplicadas a processos na indústria do couro, detergentes, alimentos e outros. As celulasas têm aplicações importantes em indústrias como alimentos, têxtil, cervejaria, farmacêutica e papel e as lipases na elaboração de biocombustíveis, alimentos, cosméticos, detergentes, entre outros (BORRELLI & TRONO, 2015; CONTESINI et al., 2018; GOEL et al., 2019).

Segundo estimativas do Grand View Research - GVR (2019), o mercado global de enzimas industriais cresceu cerca de 51,7 % entre 2014 e 2019. Estima-se que em 2024

o mercado irá movimentar mais de 9 milhões de dólares. Esse crescimento rápido é desencadeado por alguns fatores como o aumento da demanda pela indústria de alimentos e bebidas assim como o mercado de nutracêuticos. A indústria de alimentação animal e o desenvolvimento da biotecnologia industrial também contribuem generosamente para tal acréscimo do mercado de enzimas industriais (GVR, 2019).

Diversos estudos relatam o potencial de microrganismos provenientes de ambientes diferenciados como o marinho, capazes de produzir proteases neutro alcalinas (SETHI et al., 2013) uma celulase alcalina halotolerante (TRIVEDI et al., 2011) e lipases halotolerantes (NERURKAR et al., 2013), a fim de se obter novas enzimas que atendam as demandas atuais das indústrias. Características como halotolerância, tolerância a variações de pH, solventes ou metais, variações de temperatura são muito desejadas atualmente pois trazem muito mais benefícios a indústria principalmente no que diz respeito a processos que exigem uma maior estabilidade da enzima.

### **2.3.1 CELULASES**

As celulases são enzimas que atuam na hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 que formam a cadeia da celulose. Este biopolímero é o recurso natural biológico mais abundante e de caráter renovável presente na terra, no qual exerce papel essencial como componente na parede celular de plantas, diversas formas de algas e oomicetos. A celulose propriamente dita, é um homopolímero constituído apenas por moléculas de D-glicose, agrupadas em uma cadeia linear, que estão conectadas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. O aproveitamento e a utilização desse recurso natural de forma eficiente demanda da ação combinada de um conjunto de celulases: exoglucanases, endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, das quais permitem a despolimerização da cadeia celulolítica, liberando açúcares fermentáveis de grande interesse para as biorefinarias, por exemplo (SADHU & MAITI, 2013; GUPTA et al., 2019; JAYASEKARA & RATNAYAKE, 2019).

Cada uma dessas subclasses atua de forma específica sob o substrato, e por fim, acabam por gerar produtos diferentes. As exoglucanases englobam duas subclasses diferentes, as celodextrinases (EC 3.2.1.74) que atuam na remoção da celobiose dos celooligosacarídeos, e as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que atuam nas extremidades redutoras ou não redutoras da estrutura celulósica podendo ainda ser denominada como glucanoidrolase (glicose liberadora) e celobiohidrolase (celobiose liberadora) baseando-

se no produto principal obtido após sua ação. As endoglucanases ou glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) por sua vez, agem de forma randômica nos locais internos da parte amorfa da celulose, formando oligossacarídeos de comprimentos variados, assim como novas extremidades na cadeia. Já as  $\beta$ -glicosidases atuam na hidrólise de celo-oligossacarídeos e da celobiose liberando glicose, e também agindo nas extremidades não redutoras (SADHU & MAITI, 2013; SHARMA et al., 2016).

Dentre os microrganismos que produzem celulases, os fungos se destacam produzindo grandes quantidades de enzimas celulolíticas e geralmente de menor complexidade que as de origem bacteriana, proporcionando uma maior facilidade no processo de extração e purificação. No entanto, a bioprospecção de novas celulases por bactérias vem se ampliando na busca de novas enzimas específicas que podem resistir a variação de pH, temperatura ou salinidade. Além disso as bactérias geralmente apresentam uma taxa de crescimento mais rápida que os fungos, permitindo uma maior produção enzimática em um curto período de tempo (ARIFFIN et al., 2006; SADHU & MAITI, 2013).

As celulases podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos incluindo alguns fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, e *Penicillium* (PANCHAPAKESAN & SHANKAR, 2016), bactérias dos gêneros *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (IRFAN et al., 2012; IRE & BEREBOON, 2016; TIWARI et al., 2017) e actinomicetos (JAYASEKARA & RATNAYAKE, 2019). Essas enzimas apresentam um grande potencial podendo ser aplicadas em diversos processos industriais. Em biorrefinarias, durante a hidrólise enzimática da celulose proveniente de biomassa vegetal, a fim de produzir etanol de segunda geração. Na indústria têxtil, durante o processo de lavagem do jeans com o intuito de garantir um aspecto envelhecido/desbotado no produto, além de reduzir os custos gerados pelo uso de químicos e pedra-pomes nesse processo. Na indústria de alimentos/rações animais, inserido no processamento de sucos de frutas e vegetais, na produção de vinho e cerveja, além do uso dessas enzimas no processamento de alimentos para animais. Ademais, podem ser aplicadas na indústria farmacêutica, do papel e detergentes (MENENDEZ et al., 2015; SHARMA et al., 2016; JAYASEKARA & RATNAYAKE, 2019).

### 2.3.2 PROTEASES

As proteases, também chamadas de peptidases, são enzimas que atuam na quebra de ligações peptídicas, sendo classificadas em endopeptidases (E.C. 3.4.21-24) e exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), conforme o seu mecanismo de ação. As endopeptidases clivam preferencialmente as ligações das regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, podendo ser classificadas em serina peptidases (EC 3,4.21), cisteína peptidases (EC 3,4.22), aspártico peptidases (EC 3.4.23) e metalo peptidases (EC 3.4.24), de acordo com seu mecanismo catalítico. Já as exopeptidases apresentam maior afinidade pelas regiões amino-terminal e carboxil-terminal dos aminoácidos localizados nas extremidades de cadeias de aminoácidos. A atuação dessas enzimas na região amino terminal livre promove a liberação de um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases), por outro lado a atuação na região carboxi-terminal livre origina um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases) (MCDONALD, 1985; BARRETT et al., 2004).

A produção de proteases ocorre em todos os organismos, como bactérias, plantas e animais. A depender do ambiente e do organismo que a produz, um tipo de protease diferente pode ser secretada, podendo esta ser alcalina na qual tolera valores de pH mais altos, ácida que apresenta tolerância a pH mais baixos ou neutra que não tolera variações muito distantes da neutralidade (pH 7). Dentre a proteases existentes na indústria, cerca de 66% são proteases microbianas, decorrente principalmente de processos fermentativos (GURUMALLESH et al., 2019; RAZZAQ et al., 2019). Um dos gêneros mais importantes na produção de proteases é o *Bacillus*, sendo capaz de produzir enzimas proteolíticas de caráter neutro-alcálico, além de produzir proteases de características notáveis, como a alta estabilidade a temperaturas extremas, pH, solventes orgânicos, detergentes e compostos oxidantes (PANT et al., 2015; CONTESINI et al., 2018).

A aplicação das peptidases na indústria se dá de diversas formas. Na indústria alimentícia, as proteases são usadas tanto na panificação, para promover a degradação do glúten a fim de melhorar qualidade do trigo, assim como, no processo de produção de queijos, com o objetivo de hidrolisar a caseína presente no leite. Também são amplamente empregadas como componente dos detergentes e produtos tira manchas, podendo vir acompanhada de outras enzimas como amilases e lipases. Já na indústria do couro, essas enzimas são utilizadas com o intuito de reduzir a utilização do sulfeto de sódio, aplicado

no processo de remoção de pelos, garantindo assim, uma melhor qualidade do produto final e a redução na geração de resíduos químicos. Alguns outros setores de aplicações dessas enzimas são a indústria farmacêutica, têxtil e gestão de resíduos (AGUILAR & SATO, 2018; CONTESINI et al., 2018; GURUMALLESH et al., 2019; RAZZAQ et al., 2019).

### 2.3.3 LIPASES

As lipases ou glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) são enzimas que atuam na clivagem das ligações ésteres de triacilgliceróis, tendo como produto final ácidos graxos livres e glicerol. São enzimas interfaciais que podem atuar não só como esterases, mas também em reações de transesterificação, interesterificação, acidólise e aminólise (SANGEETHA et al., 2011; BORRELLI & TRONO, 2015; FERRAZ et al., 2018). No entanto, as lipases devem ser diferenciadas das esterases (E.C. 3.1.1.1) pela natureza do seu substrato. Portanto, as lipases são definidas como enzimas capazes de hidrolisar ésteres carboxílicos de acilgliceróis de cadeia longa ( $\geq 10$  átomos de carbono). Enquanto esterases hidrolisam ésteres carboxílicos de acilgliceróis de cadeia curta ( $\leq 10$  átomos de carbono) (CASAS-GODOY et al., 2018).

Além disso, as lipases apresentam determinada seletividade relacionada à sua preferência em realizar determinadas reações: regiosseletividade, tiposseletividade e enantioseletividade. O ataque preferencial de lipases em direção a uma determinada ligação éster no esqueleto de glicerol dos triglicerídeos (ligação éster primária ou secundária) é definida como regiosseletividade. A preferência por um determinado substrato, por exemplo, tri, di ou monoglicerídeos é denominado seletividade de tipo ou quimiosseletividade. Já a enantioseletividade refere-se à preferência de lipases em relação a um enantiômero particular de uma molécula quiral, em uma mistura racêmica (mistura de ambos os enantiômeros). Esses três tipos de seletividade das lipases são propriedades que ampliam suas aplicações industriais (SANGEETHA et al., 2011; CASAS-GODOY et al., 2018).

Alguns gêneros mais importantes de bactérias que são produtoras de lipase são *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (GUPTA et al., 2004). Dentre as diversas aplicações das lipases na indústria pode-se citar a produção de produtos lácteos como queijo por exemplo, a modificação de gorduras e óleos para a fabricação de manteiga e margarina ou novos óleos de cozinha, podendo ser utilizadas como aditivos em alimentos

a fim de modificar e realçar textura, odor, sabor entre outros. As lipases também são aplicadas durante a produção de lubrificantes, biodiesel e bioquerosene por meio da transesterificação de óleos vegetais obtidos de fontes renováveis/ animais, além da utilização como aditivo, para reduzir a viscosidade do biodiesel. Ademais, as lipases ainda podem ser usadas como aditivo em detergentes e agentes de limpeza, principalmente por serem ativos e estáveis a altas temperaturas e pH alcalino. Outras possíveis aplicações são na biorremediação, agricultura, indústria de cosméticos e farmacêutica (MESSIAS et al., 2011; BORRELLI & TRONO, 2015; CASAS-GODOY et al., 2018)



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as bactérias isoladas do tecido necrosado do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* e analisar produção de enzimas extracelulares.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

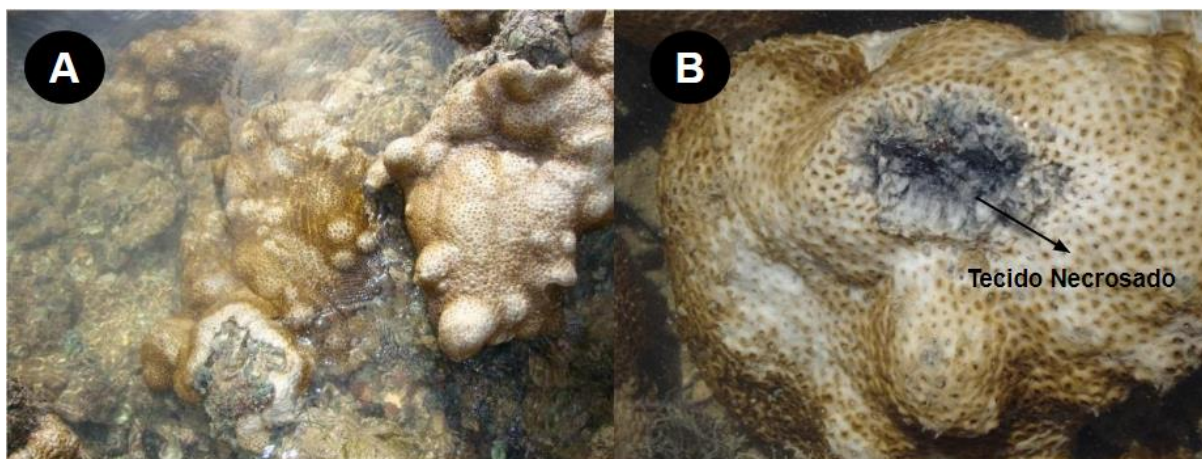
- Identificar os isolados bacterianos utilizando técnicas moleculares na base de sequenciamento de RNAr 16S isoladas do tecido necrosado do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*;
- Determinar o padrão de crescimento de isolados de bactérias em meios com diferentes concentrações de NaCl;
- Analisar a produção de proteases, lipases e celulases nos meios sólidos com os substratos específicos;
- Determinar o efeito de pH, temperatura e salinidade na atividade de celulases produzidas por isolados de bactérias mais ativos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

O presente trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) - UFPB. Os isolados utilizados neste trabalho pertencem a uma coleção de bactérias proveniente do tecido necrosado do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti 1861) obtida nos trabalhos anteriores de 2014 realizados no laboratório BIOMICRO/DBM/CCEN/UFPB (dados não publicados) (Figura. 2). As bactérias foram isoladas do tecido de zoantídeos doentes acometidos pela necrose dos recifes de Carapibus (7°18'03"S, 340 47'52"W), Paraíba e foram denominadas como N\_ e NC\_. O isolamento foi feito no meio ágar marinho (5,0 g peptona; 1,0 g extrato de levedura; 15 g de ágar e 1000 ml de água do mar filtrada), sendo que as amostras do tecido necrosado (Figura 2) foram coletadas com auxílio de um swab estéril e a semeadura foi feita por espalhamento no meio. Os isolados obtidos foram mantidos em tubos com meio ágar marinho semissólido (mesma composição já citada anteriormente com exceção do ágar, 4 g) e em tubos de Eppendorf com água destilada estéril.

Figura 2. *P. caribaeorum* sadio (A) e com a ferida necrosada (B) nos recifes de Carapibus, Paraíba



Fonte: GORLACH-LIRA, 2014.

#### 4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS

A caracterização molecular dos isolados bacterianos foi realizada em seguintes etapas: extração de DNA genômico, amplificação do gene RNAr 16S pela técnica de PCR, purificação de produtos de PCR (RNAr 16S), sequenciamento do gene RNAr 16S e análise das sequências de RNAr 16S obtidas utilizando as ferramentas de bioinformática.

Para obter o DNA genômico total, os isolados foram cultivados em caldo marinho (mesma composição já citada anteriormente sem a adição de ágar) por 24-48 horas a 30°C. O volume de 3 mL da cultura foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão TE, pH 8,0 (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M) e congeladas a -20°C.

A extração de DNA genômico dos isolados de bactérias foi realizada utilizando o Kit HiPura TM Miniprep (HiMedia), conforme as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA extraído foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

A reação de amplificação do DNAr 16S das amostras foi realizada em aparelho termociclador (Primus, EUA) utilizando 2µL do *primer* universal 26F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 2µL do 1492R (5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3') na concentração de 50 pmol/µL (LANE, 1991), 200 ng de DNA genômico (5 µL) e 45 µL da solução do kit de PCR Master Mix

(Promega), conforme as instruções do fabricante. A amplificação do gene RNAr 16S foi realizada nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C; 25 ciclos: 94°C por um minuto, 57°C por dois minutos e 72°C por dois minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% com GelRed™ (Biotium) sob uma voltagem de 80 volts. O gel foi observado e fotografado no transluminador de UV para verificar a presença da banda de 1500 pb correspondente ao gene de RNAr 16S utilizando o marcador molecular de 100 pb (Ludwig Biotec).

Em seguida os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação Kit PCR Purification – 100 Prep. (Ludwig Biotec), conforme recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

As amostras de produtos de PCR foram submetidas ao sequenciamento utilizando o *primer* 26F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG) realizado na Plataforma de Sequenciamento da UFPE, Recife-PE, onde foi utilizado o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas (500-600 pb) foram comparadas com as sequências depositadas no banco de sequências do GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando-se BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), onde foram analisadas as similaridades das sequências obtidas com as sequências presentes no banco de dados e as sequências que apresentaram similaridade  $\geq 97\%$  foram consideradas .

O alinhamento múltiplo das sequências de RNAr 16S dos isolados de bactérias e das sequências do GenBank e a construção da árvore filogenética foi realizado pelo método neighbour -joining utilizando o programa MEGA X 10.1 (KUMAR et al., 2018). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW. O método de construção de árvore filogenética utilizado foi o de máxima parcimônia com o bootstrap de 1000 e o modelo Kimura 2- parâmetros.

### **4.3 TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl**

Os isolados foram analisados com relação ao padrão de crescimento em diferentes concentrações de NaCl. O meio utilizado para a avaliação do crescimento foi o meio caldo marinho Zobell 2216 - 5 g de peptona; 1 g de extrato de levedura; 0,1 g de citrato de férrico; 19,45 g de cloreto de sódio; 8,8 g de cloreto de magnésio; 3,34 g de sulfato de sódio; 1,8 g de cloreto de cálcio; 0,55 g de cloreto de potássio; 0,16 g de bicarbonato de sódio; 0,08 g de brometo de potássio; 0,034 g de cloreto de estrôncio; 0,022 g de ácido bórico; 0,004 g de silicato de sódio; 0,0024 g de fluoreto de sódio; 0,0016 g de nitrato de amônio; 0,008 g de fosfato dissódico- (HiMedia) nas concentrações: 2%, 3%, 4%, 5%, 7,5%, 10%, 15% e 20% (m/v) de NaCl.

Os isolados foram previamente inoculados em caldo marinho Zobell por 48h, posteriormente centrifugado por 5 minutos a 10000 rpm, e ressuspensos em solução salina (0,9%). Devido a variação de crescimento dos isolados foi estipulado que a turbidez adequada para a posterior inoculação desses isolados na microplaca foi de 1,0 seguindo a escala de McFarland. Em cada poço foi adicionado 150  $\mu$ L de caldo marinho Zobell com a respectiva concentração de sal e 100  $\mu$ L da solução contendo os isolados

A análise de crescimento ocorreu através medida de absorbância avaliada em cada poço por meio do Espectrofotômetro de Microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher) do Laboratório Multiusuário da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (CCEN-UFPB). O comprimento de onda utilizado foi de 540 nm com temperatura de 37° C durante o período de 7 dias (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas). O cultivo foi realizado em duplicata. Os dados foram obtidos e foram trabalhados no Excel 2010 e GraphPad Prisma 8.0.1 onde foram realizados os cálculos referentes às médias dos valores de densidade óptica (absorbância) em cada tempo e de cada isolado avaliado, assim como, os desvios padrões.

### **4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS**

Os testes enzimáticos foram realizados em meio sólido utilizando os respectivos substratos para as enzimas de estudo: protease, celulase e lipase. Todos os testes enzimáticos foram realizados em duplicata.

#### 4.4.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para a identificação de isolados com capacidade proteolítica foi utilizado um meio mineral sólido com substrato específico contendo 20,0 g/L de gelatina (SMIBERT & KRIEG, 1994). O meio apresenta os seguintes componentes: 20,0 g de gelatina comercial, 0,1 g de cloreto de sódio, 0,5 g de fosfato dipotássico, 0,2 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,19 g de cloreto de cálcio hexahidratado, traço de sulfato ferroso, 15,0 de ágar e 1000 mL de água destilada.

Para o preparo do meio, os componentes foram dissolvidos em água destilada utilizando um agitador magnético. Em seguida foi verificado o pH (7,0) e autoclavado durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm. O meio foi vertido em placas de vidro e aguardou-se até a solidificação para posterior acondicionamento.

Assim como já explanado anteriormente, os isolados do presente estudo foram inoculados no meio gelatina para a prospecção de microrganismos produtores de enzimas extracelulares, neste caso, proteases. Utilizando uma alça de platina as bactérias foram inoculadas no centro da placa sem que estas fossem espalhadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em uma estufa bacteriológica.

Para a visualização do halo de hidrólise foi utilizado a solução de Frazier (12,0 g de cloreto de mercúrio II, 16 mL de ácido clorídrico concentrado e 80 mL de água destilada). Para o preparo dessa solução o cloreto de mercúrio (II) é misturado com o ácido clorídrico e em seguida dissolvido utilizando a água destilada. Este foi armazenado em um frasco escuro.

Com uma pipeta de pasteur a solução de Frazier foi disposta nas placas após incubação. O halo se torna aparente após alguns minutos da reação entre a solução e o meio gelatina. Após a formação do halo, a solução de Frazier foi descartada em um recipiente propício e o diâmetro dos halos e da colônia foi medido com o auxílio de uma régua. Considera-se halo de hidrólise o diâmetro total visualizado na placa incluindo o crescimento do microrganismo.

#### 4.4.2 ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Para a identificação de isolados com capacidade celulolítica foi utilizado um meio mineral sólido com substrato específico contendo 1% do substrato carboximetilcelulose (CMC) (TEATHER & WOOD, 1982). O meio apresenta os seguintes componentes: 1,0

g de carboximetilcelulose, 0,5 g de nitrato de sódio, 1,0 g de fosfato dipotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado, 1,0g de extrato de levedura, 15,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

Para o preparo do meio todos os componentes (com exceção do CMC) foram dissolvidos em água destilada com auxílio de um agitador magnético. O CMC foi adicionado por último em pequenas porções, agitando o meio com bastão magnético até que fosse dissolvido. Por fim o pH do meio foi verificado (pH=7,0) em seguida autoclavado durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm. O meio foi vertido em placas de vidro e aguardou-se até a solidificação para posterior acondicionamento. O processo de triagem dos isolados foi feito a partir da inoculação dos mesmos no meio contendo o substrato da enzima, o CMC. As placas foram incubadas por 96 horas a 37 °C em uma estufa bacteriológica.

Para a visualização do halo de hidrólise foi utilizado uma solução de lugol concentrado (1,0 g de iodo, 2,0 g de iodeto de potássio e 300 mL de água destilada). Em um almofariz o iodeto de potássio e o iodo foram macerados utilizando o pistilo e a água destilada foi adicionada lentamente até dissolver os reagentes. A solução foi armazenada em um frasco escuro para posterior utilização.

Utilizando uma pipeta de pasteur a solução foi disposta nas placas com o meio CMC até que cobrisse toda a superfície da mesma. Após alguns minutos foi possível ver os halos de hidrólise caso o isolado seja capaz de produzir a enzima em questão. O lugol presente nas placas foi descartado em um frasco propício para o descarte. Por fim, o diâmetro dos halos e da colônia foi medido com o auxílio de uma régua.

#### **4.4.3 ATIVIDADE LIPOLÍTICA**

Para a identificação de isolados com capacidade lipolítica foi utilizado um meio para a produção de lipases (KOUKER & JAEGER, 1987) com algumas modificações. A elaboração do meio foi feita a partir do preparo prévio de um meio básico, uma emulsão de óleo residual e o reagente rodamina B (1 mg/mL). O meio básico foi preparado utilizando 6,0 g de caldo nutriente HiMedia (peptona 5,0 g, cloreto de sódio 5,0 g, extrato de carne 1,5 g e extrato de levedura 1,5 g), 1,25 g de extrato de levedura, 10,0 g de ágar e 450 mL de água destilada.

Posteriormente uma emulsão com óleo residual foi preparado utilizando 50 mL de água destilada, 250 µL de Tween 80 e 30 mL de óleo vegetal residual. A solução foi

misturada até formar uma emulsão que em seguida foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos. Já a solução de rodamina B foi preparada utilizando 0,050 g do corante, no qual foi dissolvido em 50 mL de água destilada previamente esterilizada.

Para o preparo do meio, 20 mL da solução de rodamina B é adicionado na emulsão de óleo residual autoclavada, sendo misturada suavemente. Antes da inserção da rodamina B no meio está foi filtrada utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a um filtro com porosidade 0,2 µm para garantir esterilidade. Logo após, 50 mL dessa da solução de rodamina B e emulsão de óleo residual foi adicionada aos 450 mL de meio básico esterilizado e levado ao blender para promover a mistura dos componentes.

Por fim, o meio foi rapidamente vertido nas placas de Petri e aguardou-se até a sua solidificação. Assim como já explanado anteriormente os isolados do presente estudo foram inoculados no meio rodamina B utilizando a mesma técnica utilizada para celulasas e proteases. As placas foram incubadas a 37 °C por 96 horas em uma estufa bacteriológica. Para a visualização de microrganismos produtores de lipases, as placas foram submetidas a uma irradiação com luz UV 350 nm. Os isolados que demonstraram um halo fluorescente de cor alaranjada indicam que o isolado produz a enzima em questão. A ausência dessa fluorescência de cor laranja indica um resultado negativo para a produção de lipase.

#### 4.4.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO

A atividade enzimática extracelular foi expressa como índice enzimático (IE), o qual apresenta a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). O IE foi determinado segundo a fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}}$$

Desse modo, os isolados que exibiram maiores valores do IE, se apresentam como isolados potenciais na bioprospecção de enzimas extracelulares.



## 4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DO ISOLADO *P. stutzeri* NC2

A fim de avaliar a atividade enzimática sob diferentes condições (pH, temperatura e salinidade) foi realizado o cultivo em shaker do isolado *P. stutzeri* NC2 que demonstrou ser mais promissor em todos os parâmetros avaliados.

### 4.5.1 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

O meio utilizado como indutor para as celulases foi o mesmo descrito no item 4.4.2 sendo que sem a adição do ágar.

O isolado foi previamente inoculado em meio Brain Heart Infusion - BHI (Sigma-Aldrich) - cérebro de bezerro 12,5 g, carne de coração 5,0 g, peptona 10 g, cloreto de sódio 5 g, D-glicose 2,0 g e fosfato de dissódico 2,5 g - em um tubo com 10 mL por 48 horas à 37° C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação 1 mL de inóculo foi adicionado em um erlenmeyer contendo 50 mL do meio indutor no qual foi levado ao shaker a 37 °C sob a agitação de 150 rpm por 4 dias. Para a obtenção da enzima extracelular foram dispostos 1,5 mL de meio após cultivo em eppendorfs de 1,5 mL. Com o intuito de se obter o caldo livre de células os eppendorfs contendo as amostras foram submetidos a uma centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos e 30 segundos em temperatura ambiente.

Ao fim do procedimento o sobrenadante foi disposto em outro tubo e o *pellet* foi descartado. As amostras enzimáticas foram acondicionadas em geladeira (6-10 °C) para análises posteriores.

A análise da influência do pH foi feita de forma qualitativa utilizando o meio descrito no item 4.4.2 alterando o pH e a temperatura de incubação. Foram preparados os tampões acetato de sódio para o pH 5 e o tampão fosfato nos pH 6, 7 e 8. Os tampões foram adicionados ao meio substituindo a água destilada, ao fim do preparo do meio os pH foram verificados e corrigidos quando necessário. Para avaliar a atividade enzimática do sobrenadante foram realizados 3 poços em cada placa com o diâmetro de 9 mm onde foram adicionados 100 µL do sobrenadante livre de células. O controle utilizado foi o caldo indutor autoclavado. As placas foram incubadas em duas temperaturas diferentes: 37 e 50 °C nos pH 5, 6, 7 e 8 e em duplicata. Estas foram incubadas por 24 horas em

estufa bacteriológica e reveladas utilizando a solução de lugol citada no item 4.4.2. Os halos de hidrólise foram medidos com o auxílio de uma régua.

#### **4.5.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA**

Após a identificação da melhor condição para a atividade celulolítica o mesmo sobrenadante foi submetido ao teste de salinidade. Foi utilizado o mesmo meio citado nos itens item 4.4.2 e 4.5.1 variando apenas a concentração de NaCl no meio. As 3 concentrações utilizadas foram 2%, 5% e 7,5% baseando-se nos resultados do padrão de crescimento dos isolados testados sob diferentes concentrações de NaCl. O procedimento experimental ocorreu conforme o já citado no item 4.5.1, nesse caso baseando-se na melhor condição as análises foram feitas em duplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS

A partir do alinhamento da sequência parcial de RNAr 16S no BLAST foi possível identificar as espécies que mais se assemelham com os isolados provenientes do tecido necrosado de *Palythoa caribaeorum* e estes estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das bactérias isoladas do tecido necrosado de *P. caribaeorum*

<b>Gênero/Espécie</b>	<b>Isolado</b>
<i>Bacillus</i> sp.	NC1, NC3, NC4, NC7, N1, N5
<i>Bacillus subtilis</i>	NC8
<i>Arthrobacter koreensis</i>	NC9, NC10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N2
<i>Exiguobacterium</i> sp.	NC6
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NC2, NC5

Foram considerados as maiores porcentagem de identidade (>97%) e os valores de E-value iguais a 0,0, sendo que para alguns dos isolados mais de uma espécie com alta similaridade foi obtida, sendo assim foram identificadas quanto ao gênero (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos isolados de bactérias do tecido necrosado de *P. caribaeorum* baseada nas sequências parciais de RNAr 16S e nos resultados do BLASTn

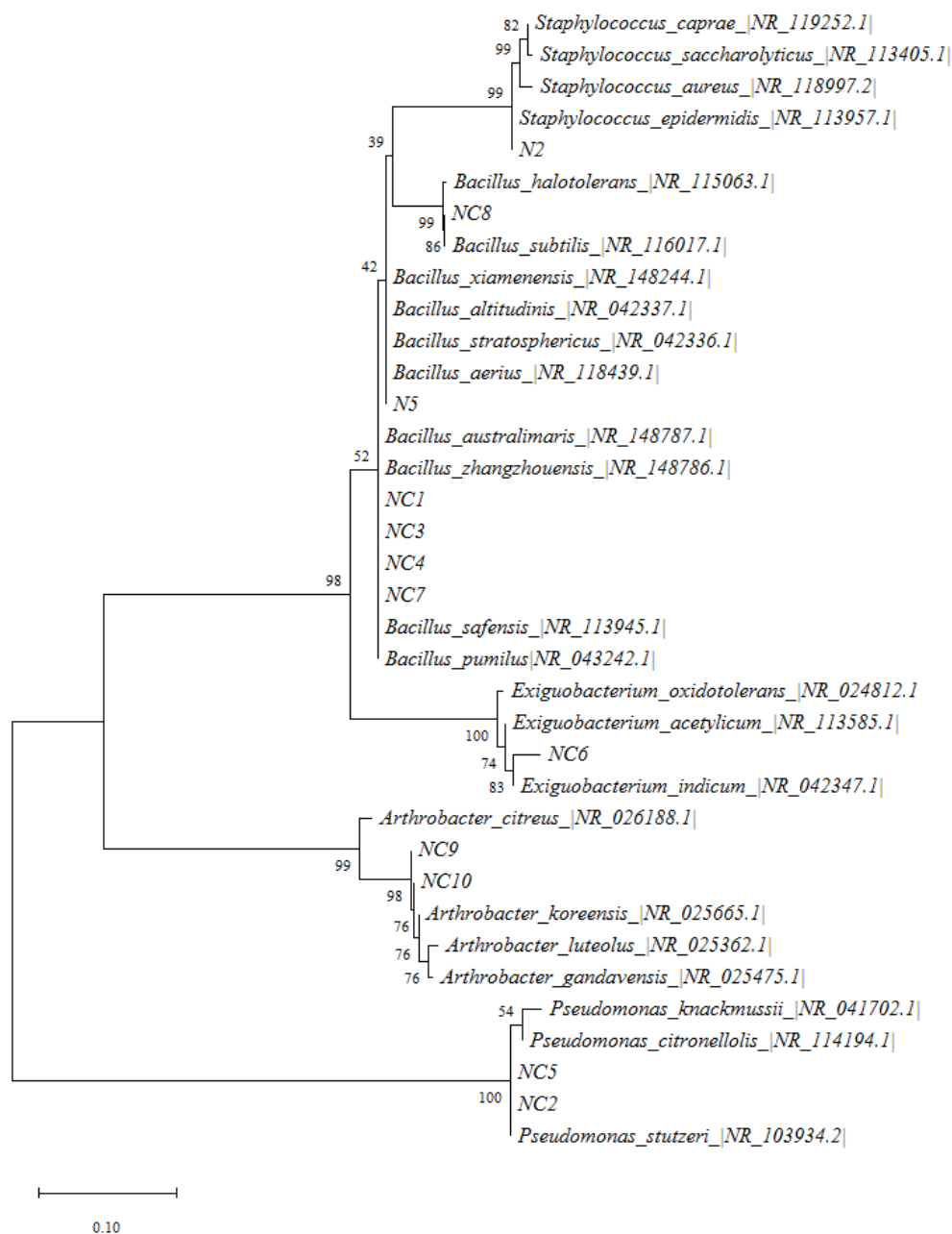
Isolados	Alinhamento mais significativo	Código de acesso-NCBI	E-value	Identidade Máxima %
<b>Filo – Firmicutes</b>				
N5*	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	0,0	99,5
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	NR_042336.1	0,0	99,5
	<i>Bacillus altitudinis</i>	NR_042337.1	0,0	99,5
NC1*, NC3, NC4,	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	NR_148786.1	0,0	99,5
	<i>Bacillus pumilus</i>	NR_043242.1	0,0	99,5
	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1	0,0	99,5
NC8*	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_112116.	0,0	99,0
NC6	<i>Exiguobacterium indicum</i>	NR_042347.1	0,0	98,8
	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	NR_113585.1	0,0	98,6
N2*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NR_113957.1	0,0	99,4
<b>Filo - Actinobacteria</b>				
NC9, NC10	<i>Arthrobacter koreensis</i>	NR_025665.1	0,0	99,8
<b>Filo- Proteobacteria</b>				
NC2*, NC5*	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NR_103934.2	0,0	99,6

\* Fonte: Pereira, 2020.\*\*ND – Não determinado

Os resultados mostraram que a maior parte dos isolados do tecido necrosado de *P. caribaeorum* pertence ao filo Firmicutes (69,2 %) seguido de Proteobacteria (15,4%) e Actinobacteria (15,4%).

Vários estudos trazem a diversidade bacteriana presente no *P. caribaeorum*, do qual é conhecido pelo nome popular de baba-de-boi devido ao muco extremamente viscoso secretado pelo organismo. Em 2011, Campos identificou o perfil bacteriano presente no muco de *P. caribaeorum* sadio e branqueado dos recifes de Porto de Galinhas localizado no litoral Sul de Pernambuco, no qual divergiu dos resultados encontrados neste estudo pois a maioria das bactérias identificadas pertencem ao filo Proteobacteria (84%). Essa variação pode ser decorrente de alguns agentes estressores ambientais como a alteração climática da temperatura e acidez dos mares, assim como o processo de eutrofização da água do mar, originada da ação humana, podem promover mudanças no microbioma dos corais afetando pôr fim a saúde e a sobrevivência desses organismos no ambiente (SUTHERLAND et al., 2004; DUNPHY et al., 2019).

Figura 3. Árvore filogenética de bactérias isoladas do tecido necrosado de *P. caribaeorum* e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2- parâmetros



\*Os valores de bootstrap mostradas na árvore foram obtidos com base em 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostrados em parênteses.

Entre os isolados do filo Firmicutes, os isolados N2 e NC8 apresentaram similaridade com as espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*, respectivamente (Tabela 2, Figura 3). Por sua vez os isolados NC1, NC3, NC4, NC7 e N5 apresentaram 99,5% de similaridade com várias espécies do gênero *Bacillus* (*B.*

*safensis*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. aerius*, *B. zhangzhouensis*, *B. altitudinis*, *B. xiamenensis* e *B. australimares*). O isolado NC6 mostrou 98,4 – 98,6 de similaridade com as espécies *Exiguobacterium indicum* e *acetylicum*. Os isolados NC9 e NC10 pertencentes ao filo *Actinobacteria* mostraram 99,8% da similaridade com a espécie *Arthrobacter koreensis*. Os isolados do filo *Proteobacteria* (NC2 e NC5) apresentaram 99,6 % da similaridade com a espécie *Pseudomonas stutzeri*.

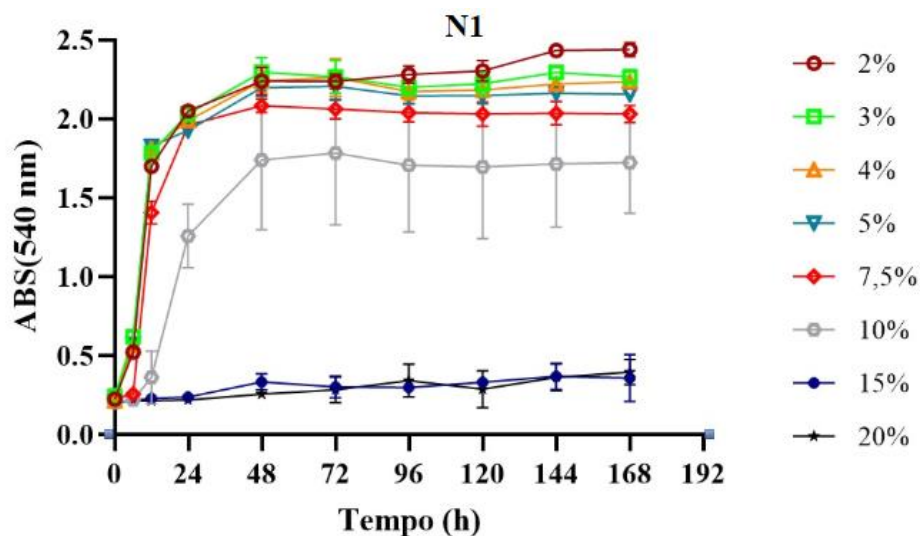
Em 2017, Melo verificou a partir do muco de *P. caribaeorum* presente na área recifal da praia de Porto de Galinhas que a maior parte dos seus isolados (34,5%) eram *Bacillus*. Além disso a autora também identificou nove isolados do gênero *Staphylococcus* e outros nove do gênero *Exiguobacterium*, assim como no presente trabalho, no qual um dos isolados N2 apresentou-se como *Staphylococcus epidermidis* e outro isolado NC6 como *Exiguobacterium* sp. Já os isolados NC2 e NC5 foram identificados como sendo *P. stutzeri*, o que corrobora com os estudos que identificaram o mesmo gênero de bactéria presente na microbiota do zoantídeo *P. caribaeorum* presente nos recifes areníticos na praia de Paracuru no Ceará (RABELO, 2012).

O tecido necrosado da colônia do zoantídeo do qual foram obtidos os isolados de bactérias encontrava-se em processo de decomposição, provavelmente devido a ação de vários grupos de microrganismos. A maioria das espécies que apresentaram alta similaridade com os isolados analisados são conhecidos pela produção de enzimas extracelulares, tais como espécies do gênero *Bacillus*, podendo acelerar a deterioração do tecido do zoantídeo. de Veras e colaboradores (2018) observaram a produção de diversas enzimas incluindo protease, celulase, amilase e xilanase pelo isolado identificado como *B. subtilis* provenientes recifes de corais. Outros estudos também demonstram a capacidade desse gênero na produção de enzimas (TRIVEDI et al., 2011; NERURKAR et al., 2013; CONTESINI et al., 2018).

## **5.2 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl**

Entre os 13 isolados analisados, o isolado *Bacillus* sp. N1 (Figura 4) foi capaz de crescer em uma concentração de 10% (m/v) de NaCl, revelando-se um microrganismo halófilo moderado.

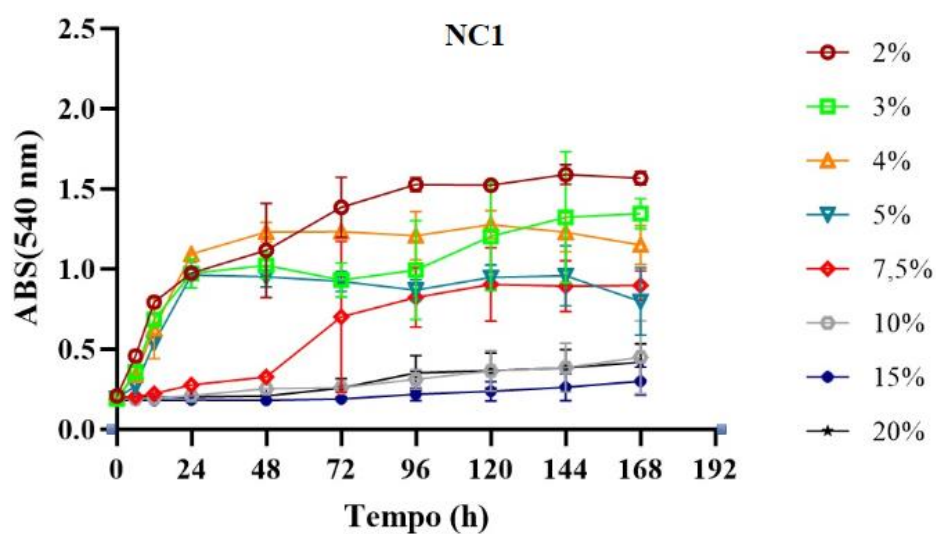
Figura 4. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. N1 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

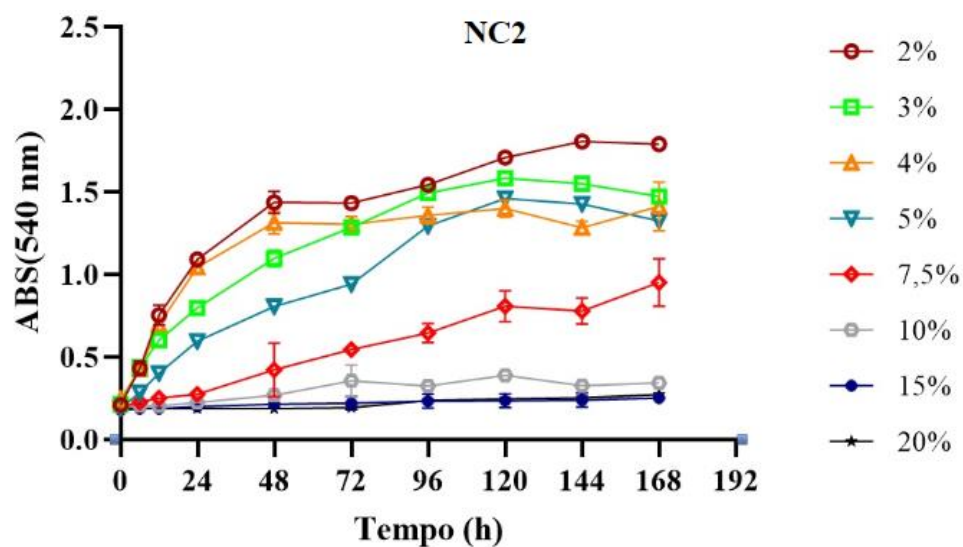
Os isolados *Bacillus* sp. NC1, NC2, NC7 e NC8 (Figuras 5, 6, 9,), assim como *S. epidermidis* N2 (Figura 11), *P. stutzeri* NC5 (Figura 7) e *Exiguobacterium* sp. NC6 (Figura 8), foram capazes de crescer em meio de cultura com 7,5% de NaCl, no entanto os isolados *S. epidermidis* N2 e *P. stutzeri* NC5 só iniciaram o crescimento a partir do 6 dia de incubação (144h).

Figura 5. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. NC1 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



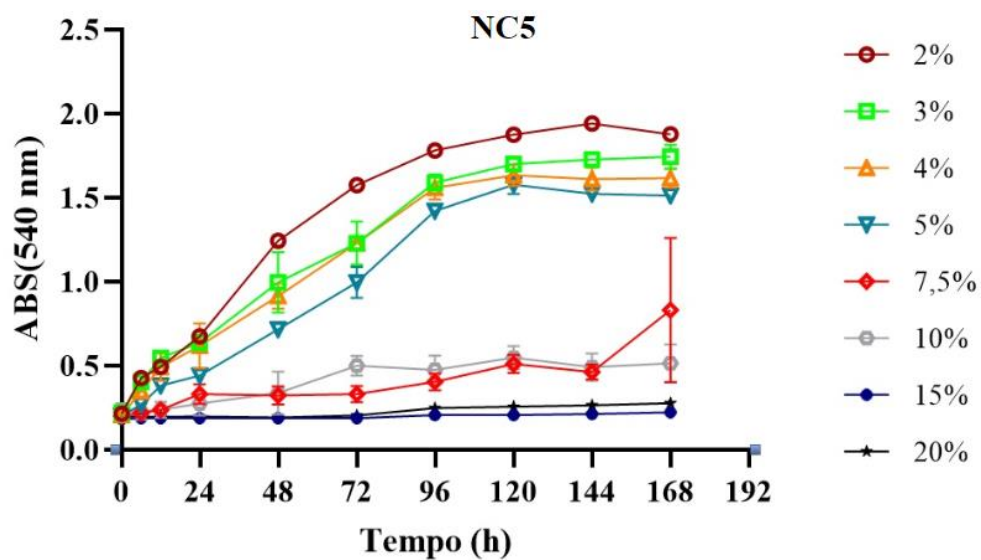
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 6. Curva de crescimento do isolado *P. stutzeri* NC2 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

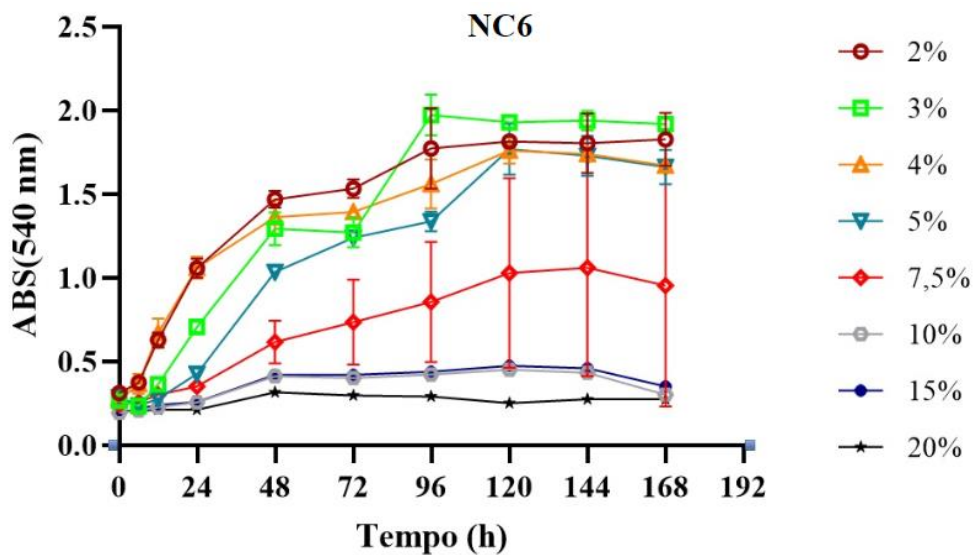
Figura 7. Curva de crescimento do isolado *P. stutzeri* NC5 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

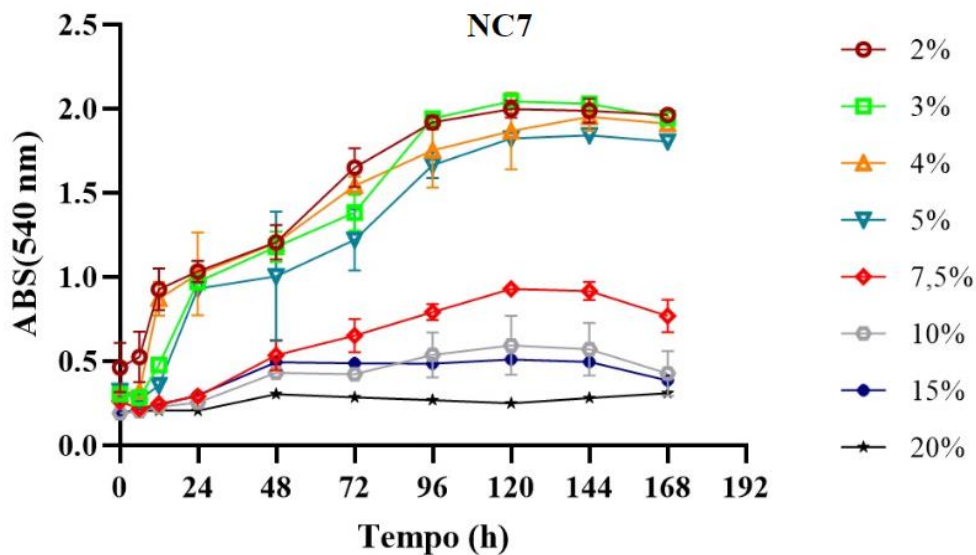


Figura 8. Curva de crescimento do isolado *Exiguobacterium* sp. NC6 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



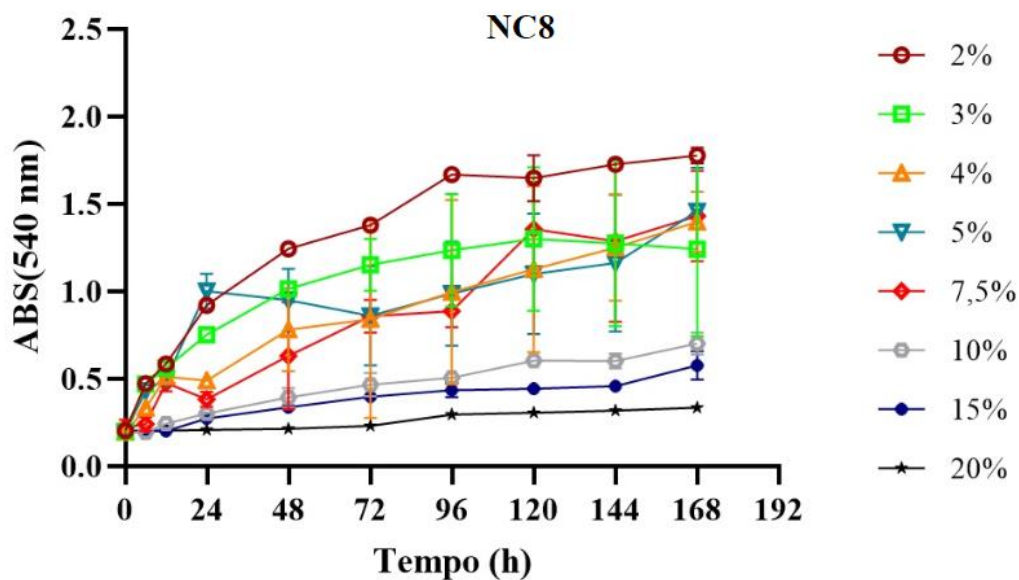
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 9. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. NC7 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



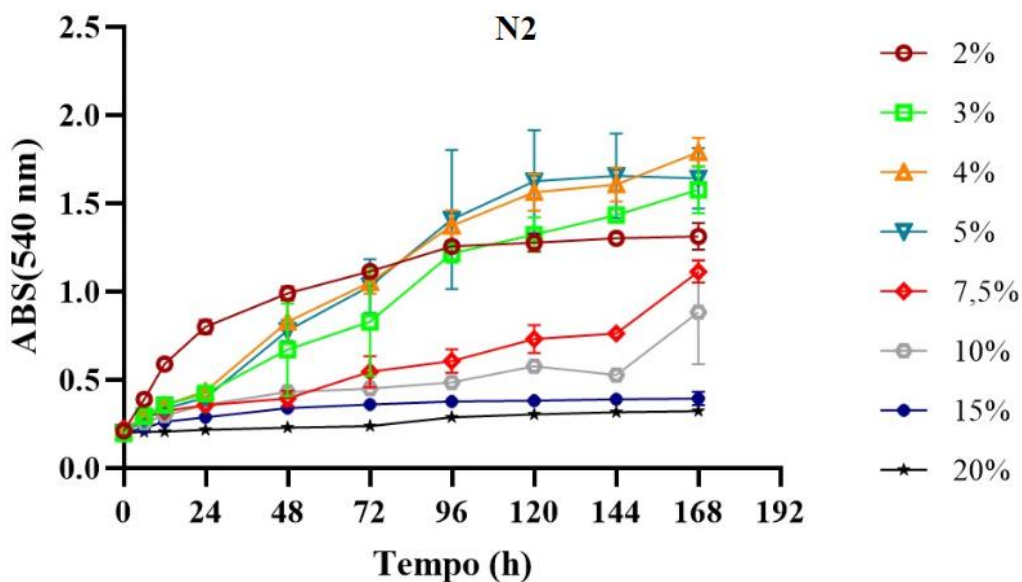
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 10. Curva de crescimento do isolado *B. subtilis* NC8 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 11. Curva de crescimento do isolado *S. epidermidis* N2 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl

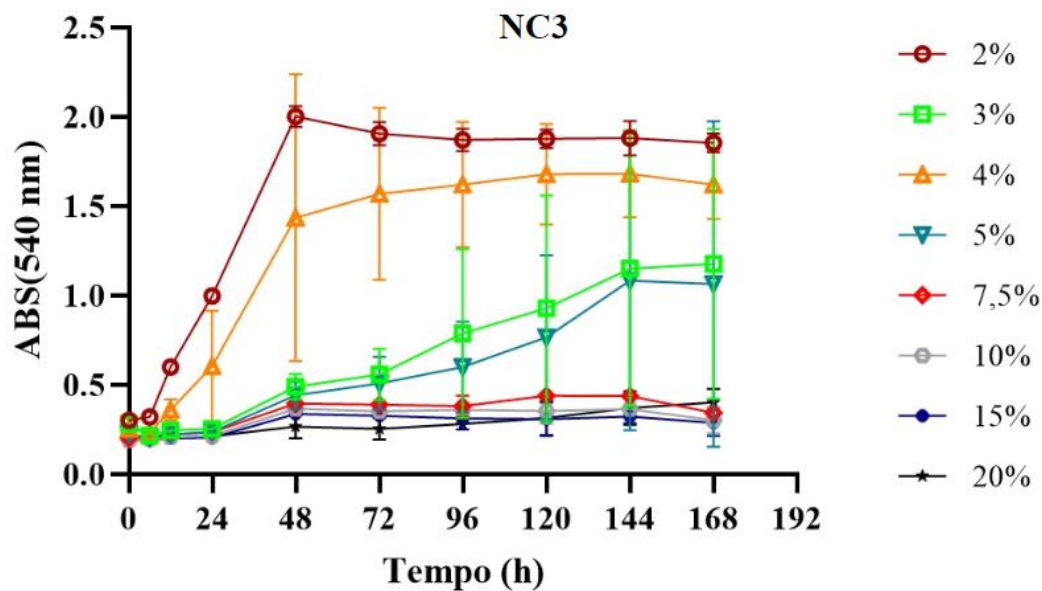


Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os outros isolados *Bacillus* sp. NC3, NC4 e N5 (Figura 12, 13 e 15), *A. koreensis* NC10 (Figura 14) apresentaram um crescimento microbiano até 5% (m/v) de NaCl. Apenas o isolado *A. koreensis* NC9 não foi capaz de crescer em 5% de NaCl crescendo

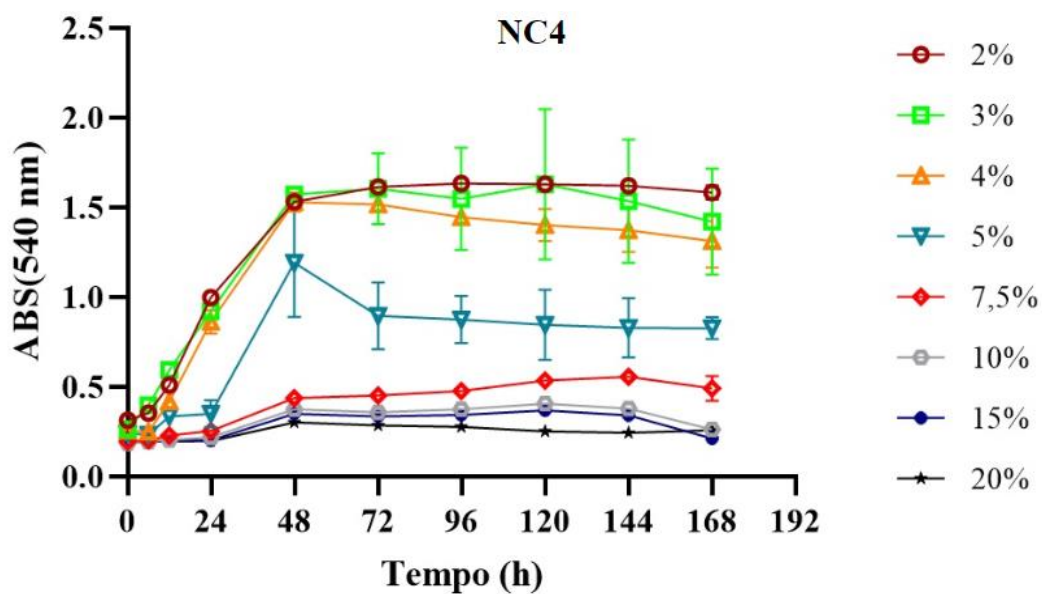
até 4% de NaCl (Figura 16). Nenhum isolado apresentou o crescimento em meios com 15 e 20% de NaCl.

Figura 12. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. NC3 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



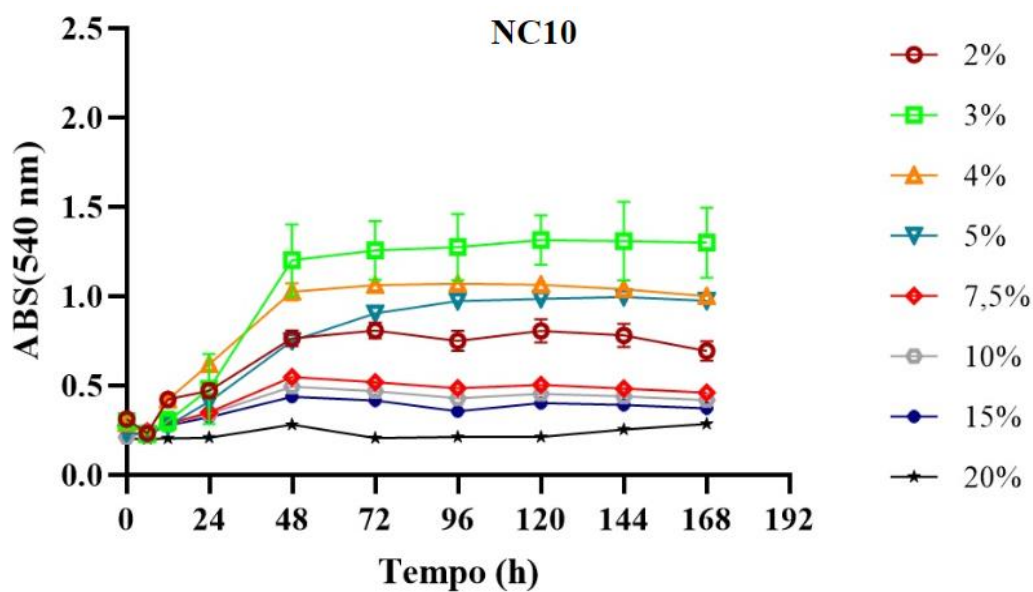
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 13. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. NC4 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



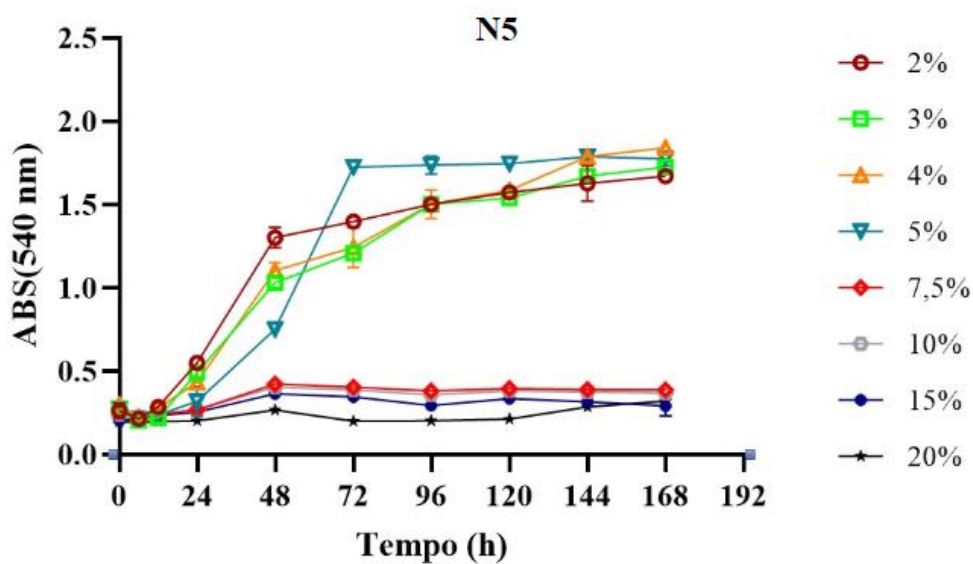
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 14. Curva de crescimento do isolado *A. koreensis* NC10 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



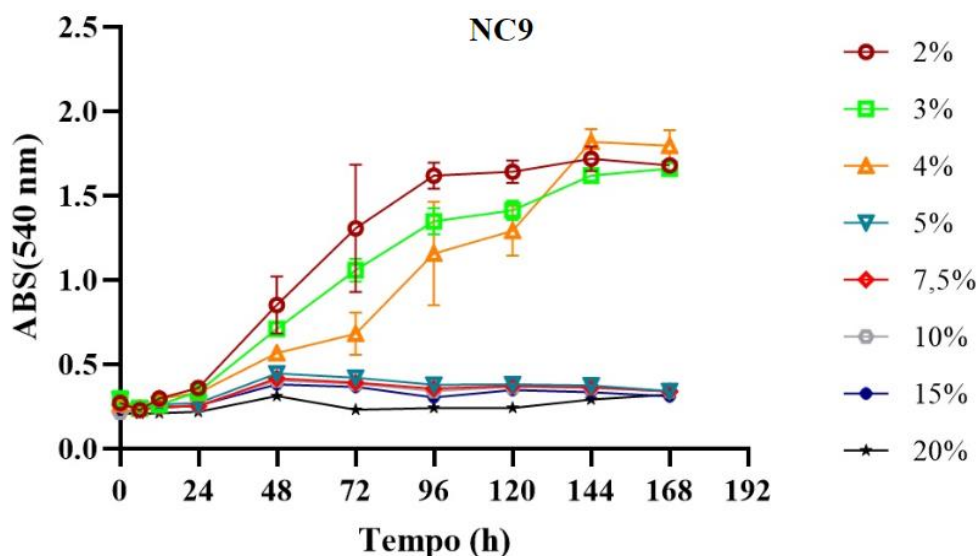
Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 15. Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. N5 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 16. Curva de crescimento do isolado *A. koreensis* NC9 em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Conforme o NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration (2018), a concentração de NaCl no mar é de aproximadamente 3,5%. Estudos anteriores como o de Araújo (2013), verificou-se que a média de salinidade das águas dos recifes de corais do Cabo Branco-PB era de aproximadamente 3,4%. Sendo assim, já era esperado que estes isolados conseguissem crescer na faixa entre 3,5-4% de sal (NaCl). De acordo com a tolerância e a necessidade de alguns organismos em crescer em condições salinas, estes podem ser definidos como halotolerantes (1-6% NaCl), halófilos moderados (6-15% NaCl) ou halófilos extremos (15-30% NaCl) (MADIGAN et al., 2016).

Basicamente, as bactérias halófilas são caracterizadas como organismos dos quais necessitam viver em ambientes com concentração salina de moderada a alta, sendo assim estes apresentam uma maquinaria enzimática adequada para tal condição. Devido a essa característica esses microrganismos são interessantes para a triagem de enzimas, principalmente para aplicação biotecnológica e também industrial (TRIVEDI et al., 2011; ALJOHNY, 2015). Assim como os halófilos, os halotolerantes também desempenham um papel muito importante para a descoberta de novas biomoléculas. Estes diferentemente dos halófilos não necessitam de uma concentração de sal elevada para crescer, porém, possuem a capacidade de se desenvolver em ambientes com alta concentração de sal variando de espécie para espécie (PINILLA, 2016).

Dentre todos os isolados tem-se que apenas *Bacillus* sp. NC3, NC4 e N5, e *A. koreensis* NC9 e NC10, demonstraram um perfil bacteriano halotolerante. Enquanto que os demais isolados *Bacillus* sp. NC1, NC7, NC8 e N1, *P. stutzeri* NC2 e NC5, *Exiguobacterium* sp. NC6 e *S. epidermidis* N2 são considerados halófilos moderados.

Lee et al. (2003), identificaram um isolado de mesma espécie *Arthrobacter koreensis* sp. nov., no entanto este apresenta apenas a característica álcali tolerante, ou seja, tolera valores de pH mais alcalinos. Outra espécie também proveniente do mar *Arthrobacter halodurans* sp. nov. apresenta a característica halotolerante com um range de crescimento em NaCl de 0-12% (m/v), o que difere do isolado NC9 (Chen et al., 2009).

Na literatura há relatos de isolados de bactérias da espécie *Pseudomonas stutzeri* que apresentam uma característica halotolerante moderada (LI et al., 2012) e halófila moderada (PARWATA et al., 2014). Há registro também de um isolado de caráter halófilo pertencente ao gênero *Staphylococcus* (OLIVEIRA et al., 2015), corroborando com os dados deste trabalho (N2).

Algumas bactérias do gênero *Exiguobacterium* também são identificadas como sendo halotolerantes, como demonstrado no estudo de Bose e colaboradores (2018), no qual testaram a eficiência do isolado proveniente de amostras de água de um deserto de sal no processo de descoloração de corantes têxteis. Já Mohapatra et al. (2017) identificou a característica halotolerante do isolado *E. indicum* do qual foi obtido de um ambiente salino e apresentando crescimento até 11% (m/v) em NaCl sendo o melhor crescimento observado entre 0,5-5%.

O gênero *Bacillus* é abordado na literatura diversas vezes em relação a isolados que são halotolerantes e halófilos. Agregado a isso, diversos autores buscam bioprospectar enzimas e quaisquer outros metabólitos de grande utilidade e aplicação para a indústria. Kalwasińska, e colegas (2018), ilustraram a potencial aplicação de uma protease alcalina e halófila produzida por *B. luteus* H11 nas indústrias alimentícia, detergente e farmacêutica, e também na biorremediação ambiental. Já no trabalho de Arul e colaboradores (2017), foi avaliado o potencial de nanopartículas de prata com metabólito de acetato de etila obtido através da bactéria halófila *Bacillus cereus* A30 a fim de combater bactérias multirresistentes. Isso demonstra o potencial de bactérias que esse gênero apresenta, assim como as características de tolerância a diversos fatores como pH e salinidade.

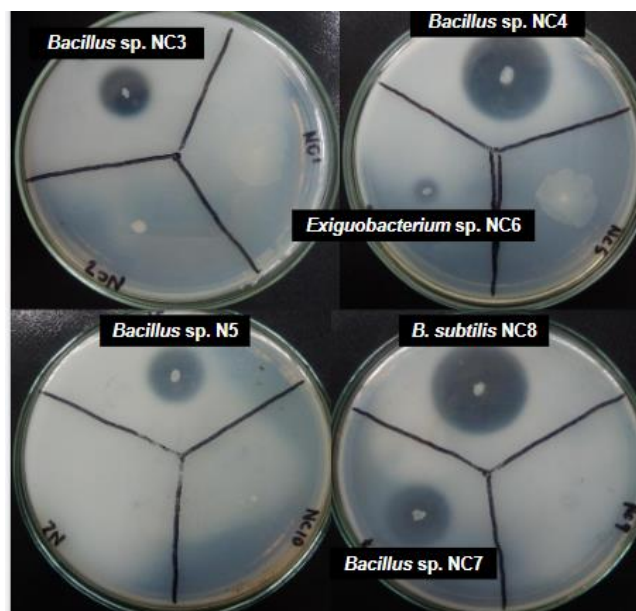
### 5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS

Dentre os isolados avaliados todos produziram ao menos uma das enzimas analisadas (protease, celulase e lipase). A obtenção de enzimas provenientes de bactérias marinhas tem aumentado devido às diversas propriedades que estas podem ter, como termoestabilidade e tolerância a altas concentrações de sal (LIMA e PORTO, 2016).

#### 5.3.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A partir do teste qualitativo para atividade proteolítica foram identificados 6 isolados capazes de produzir proteases sendo estes *Bacillus* sp. NC3, NC4, NC7, NC8 e N5, e *Exiguobacterium* sp. NC6. Os maiores halos de hidrólise foram do *Bacillus* sp. NC8 e NC4 representantes do gênero *Bacillus*. A Figura 17 mostra os halos de hidrólise dos isolados de bactérias positivos para a produção. de proteases.

Figura 17. Os halos de hidrólise de gelatina dos isolados de bactérias positivas para protease: *Bacillus* sp. NC3, NC4, NC7 e N5, *B. subtilis* NC8 e *Exiguobacterium* sp. NC6



Fonte: Autoria Própria, 2020.

O gênero *Bacillus* se apresenta como sendo um dos principais produtores de proteases corroborando com o presente trabalho, tendo em vista que dos seis isolados produtores de proteases, cinco são desse gênero. Além disso as bactérias desse gênero são

capazes de produzir altos rendimentos de enzimas proteolíticas sejam elas neutras ou alcalinas com propriedades muito interessantes para a indústria, como estabilidade a variações de pH, a solventes orgânicos, detergentes e alterações na temperatura (SAGGU & MISHRA, 2017; CONTESINI et al., 2018).

Pant e colaboradores (2015) produziram e semi-purificaram uma protease oriunda de *B. subtilis*, mesma espécie do isolado *B. subtilis* NC8 do presente estudo. O autor ainda avaliou três substratos diferentes na produção de proteases que foram: gelatina, caseína e leite desnatado. Dentre os três, o meio contendo gelatina se mostrou ser o mais promissor na produção, obtendo-se um halo de 22 mm, enquanto que utilizando o mesmo substrato para o isolado *B. subtilis* NC8 este apresentou um halo de 29,7 mm.

As proteases provenientes de tal microrganismo tem demonstrado uma ampla variedade de propriedades que agregam valor ao produto, justificando o fato de serem tão representativas da maioria das vendas mundiais de enzimas (CONTESINI et al., 2018). Desde a produção de proteases compatíveis com detergentes comerciais (NASCIMENTO & MARTINS, 2006), a estabilidade a pH alcalinos (BORKAR, 2018), e enzimas termotolerantes extracelulares (UDDIN et al., 2017) as proteases se destacam por sua alta aplicabilidade no meio industrial.

Os isolados *Bacillus* sp. NC3, NC7 e N5 apresentaram halos de hidrólise entre 13 a 17 mm de diâmetro e o isolado *Exiguobacterium* sp. NC6 apesar de apresentar atividade proteolítica, demonstrou um halo pequeno quando comparado com os demais isolados. Tendo como base o índice enzimático (IE) (Tabela 3) pode-se avaliar melhor a atividade enzimática dos microrganismos do presente estudo, pois altos valores sugerem uma maior liberação de enzimas para o meio extracelular, facilitando assim futuros processo de downstream



Tabela 3. Atividade enzimática dos isolados estimada pelo valor do índice enzimático (protease e celulase) ou presença da fluorescência (lipase)

Gênero/Espécie	Isolado	Índice enzimático (IE)		
		Protease	Celulase	Lipase*
	NC1	-	4,21	+
	NC3	5,36	-	++
<i>Bacillus</i> sp.	NC4	5,40	1,05	-
	NC7	4,38	-	+++
	N5	4,33	-	++
	N1	-	11,50	-
<i>B. subtilis</i>	NC8	8,15	3,07	+
<i>Exiguobacterium</i> sp.	NC6	3,00	-	+
	NC9	-	1,33	+
<i>A. koreensis</i>	NC10	-	2,73	-
<i>S. epidermidis</i>	N2	-	-	+++
	NC2	-	14,15	+
<i>P. stutzeri</i>	NC5	-	3,42	++

\*Os sinais de + indicam a intensidade de fluorescência. Baixo (+), Moderado (++) e Alto (+++)

Apesar do isolado *Bacillus* sp. NC4 ter apresentado um halo de hidrólise do mesmo tamanho (Figura 17) que o *B. subtilis* NC8, o tamanho da colônia é maior, o que por fim acaba influenciando no valor final do IE demonstrando a importância do cálculo do índice para a uma melhor identificação de potenciais produtores de enzimas extracelulares.

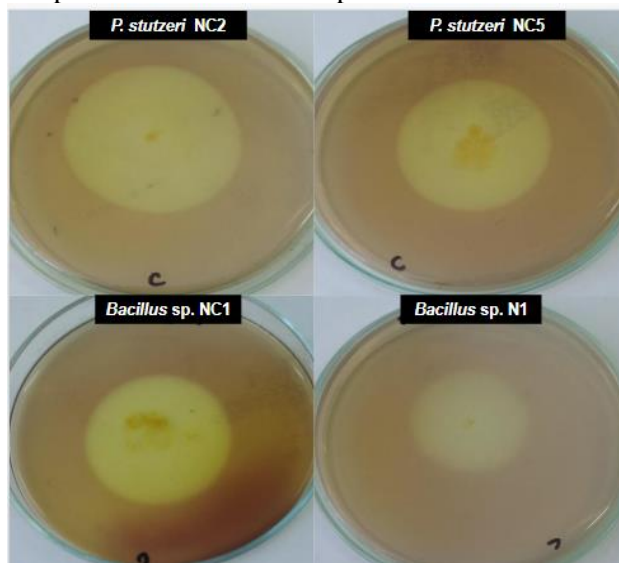
Os isolados representantes do gênero *Bacillus*, se destacam pela versatilidade e grande diversidade de proteases como serino proteases (GAUR et al. 2014), e outras

proteases com características termo alcalinas (SINGH et al., 2010) e solvente tolerantes (BOSE et al., 2014).

### 5.3.2 ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Em relação a produção de celulases temos que 61,5 % dos isolados demonstraram atividade celulolítica sendo que a maior parte é representado por bactérias do gênero *Bacillus* e o restante são bactérias identificadas como sendo do gênero *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. Os isolados com maiores halos de hidrólise para CMC estão ilustrados na Figura 18 Observou-se que os isolados *P. stutzeri* NC2 e *Bacillus* sp. N1 apresentaram os maiores valores de IE, 14,15 e 11,50 respectivamente (Tabela 3). Além disso, de todas as enzimas estudadas essas foram as duas que apresentaram o maior halo de hidrólise com 43 mm e 34,5 mm.

Figura 18. Os halos de hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) dos isolados de bactérias ativas para celulase: *Bacillus* sp. NC1 e N1 e *P. stutzeri* NC2 e NC5



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os fungos possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas celulolíticas e geralmente de menor complexidade que as de origem bacteriana, além de uma maior facilidade no processo de extração e purificação. No entanto, a bioprospecção de novas celulases por bactérias vem se ampliando e estão sendo mais explorados muito porque as bactérias tendem a habitar uma variedade de nichos ambientais e industriais, podendo apresentar características resistentes às tensões ambientais como variação de pH,

temperatura ou salinidade. Além disso elas geralmente apresentam uma taxa de crescimento mais rápida que os fungos, permitindo uma maior produção enzimática (ARIFFIN et al., 2006; SADHU & MAITI, 2013).

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* já vem sendo estudadas enquanto a produção de celulases. Shankar & Isaiarasu (2011) avaliaram a produção de celulases por *B. pumilus* variando as condições de cultivos como fonte de carbono, nitrogênio, pH, salinidade, dentre outros parâmetros a fim de se obter uma maior produtividade. Por sua vez, Trivedi e colaboradores (2011) identificaram uma celulase alcalina halotolerante a partir do isolado marinho *B. flexus*, no qual passou pelo mesmo teste de screening utilizando o ágar com CMC do presente estudo. O autor ainda caracterizou a enzima verificando a sua estabilidade frente a diversas condições como a alteração do pH, salinidade, metais pesados e etc.

Xue et al. em 2018, identificou o potencial de uma endoglucanase para aplicação em processos biotecnológicos de produção de bioetanol. A enzima foi obtida através da bactéria *Bacillus subtilis* na qual demonstrou tolerância ao etanol além de uma melhor atividade e termoestabilidade quando em solução etanólica. Ademais o gênero também é capaz de produzir  $\beta$ -glicosidases de interesse industrial tendo em vista características como tolerância a sais (LEE et al., 2015) e termoestabilidade (TIWARI et al., 2017).

Sethi e colaboradores (2013) verificaram a atividade celulolítica de quatro isolados bacterianos, dentre estes, dois pertencem ao mesmo gênero que os isolados *P. stutzeri* NC2 e *Bacillus* sp. N1, *P. fluorescens* e *B. subtilis* dos quais foram submetidos a alterações das condições durante o cultivo e outros pós cultivo. Tais isolados apresentaram uma boa estabilidade na faixa de pH neutro-alcalina e uma boa estabilidade térmica, demonstrando serem potenciais enzimas de aplicação industrial.

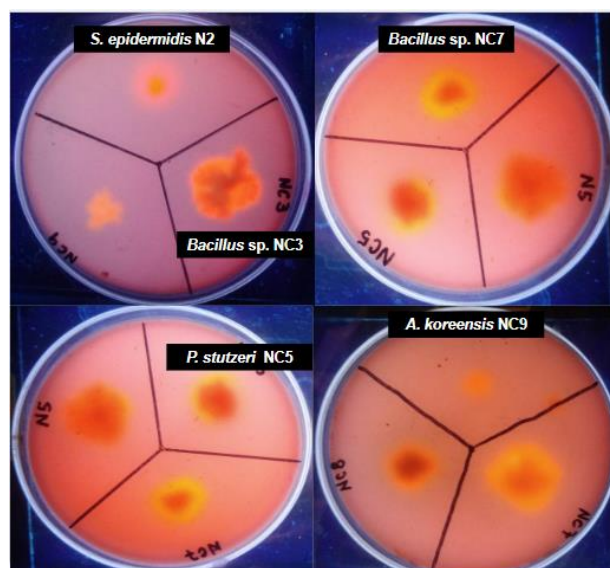
### 5.3.3 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Dentre todas as enzimas avaliadas tem-se que a produção de lipases foi a mais frequente. A maioria dos isolados (76,9%) foram capazes de produzir essa enzima, sendo que pelo menos um representante de cada gênero demonstrou atividade lipolítica. Estes resultados corroboram com os encontrados por Ramlath e colaboradores (2018) que verificaram a atividade lipolítica de isolados oriundos do ecossistema de corais da ilha de Kiltan na Índia. Dos dezesseis isolados obtidos pelo autor cerca de aproximadamente 87% a 93% apresentaram atividade enzimática mesmo com a demonstração de halos não tão

expressivos. A alta porcentagem de bactérias capazes de produzir lipases frente às outras hidrolases, pode ser justificado pelo simples fato de que os tecidos moles dos corais construtores de recifes são ricos em lipídios, sendo assim, essa capacidade de degradar tal composto seja um ponto importante para a relação coral-microbiota (IMBS, 2013).

Dentre os isolados produtores de lipases o isolado *Bacillus* sp. NC7 e o *S. epidermidis* N2 se destacaram mostrando os halos alaranjados fluorescentes de forte intensidade (Figura 19). Essa intensidade da fluorescência, ocorre devido à presença do corante Rodamina B, que se complexa com os ácidos graxos liberados após a hidrólise dos triglicerídeos, emitindo assim, uma maior fluorescência. A partir disso quanto maior for a liberação de ácidos graxos maior será a intensidade de fluorescência.

Figura 19. Isolados de bactérias ativos na produção de lipases: *S. epidermidis* N2, *A. koreensis* NC9, *P. stutzeri* NC5 e *Bacillus* sp. NC3 e NC7



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Segundo Gupta e colaboradores (2004), o gênero *Bacillus* se caracteriza como um dos importantes gêneros produtores de lipases. Outros estudos como o de Nerurkar e colegas (2013), demonstram a potencial aplicabilidade de lipases como aditivo em formulações de detergentes. A lipase foi obtida de uma bactéria halófila identificada como *B. sonorensis* exibindo alta atividade em condições alcalinas e da temperatura ambiente até 60 °C. Já Hassan e colaboradores (2018) analisaram 20 isolados bacterianos marinhos obtidos do Mediterrâneo onde todos apresentaram capacidade lipolítica, sendo que o produtor de lipase mais promissor (hidrólise lipolítica 20 mm) foi identificado também como *B. cereus*.

O gênero *Staphylococcus*, por sua vez também apresenta trabalhos relacionados a obtenção de lipases extracelulares, das quais estas demonstram certa estabilidade a variação de pH (6,0-9,0), salinidade, temperatura e a solventes orgânicos (álcoois de cadeia longa) (DAOUD et al., 2013). Outra lipase solvente estável também foi obtida por um bactéria do mesmo gênero que se mostrou promissora devido à sua estabilidade em solvente orgânico, podendo ser usada como biocatalisador para sintetizar altos níveis de moléculas de valor agregado, assim como pode ser considerada a escolha ideal para aplicações em formulações de detergentes, devido à sua alta estabilidade e compatibilidade frente tais compostos (BEN BACHA, et al. 2016).

#### **5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DO ISOLADO *P. stutzeri* NC2**

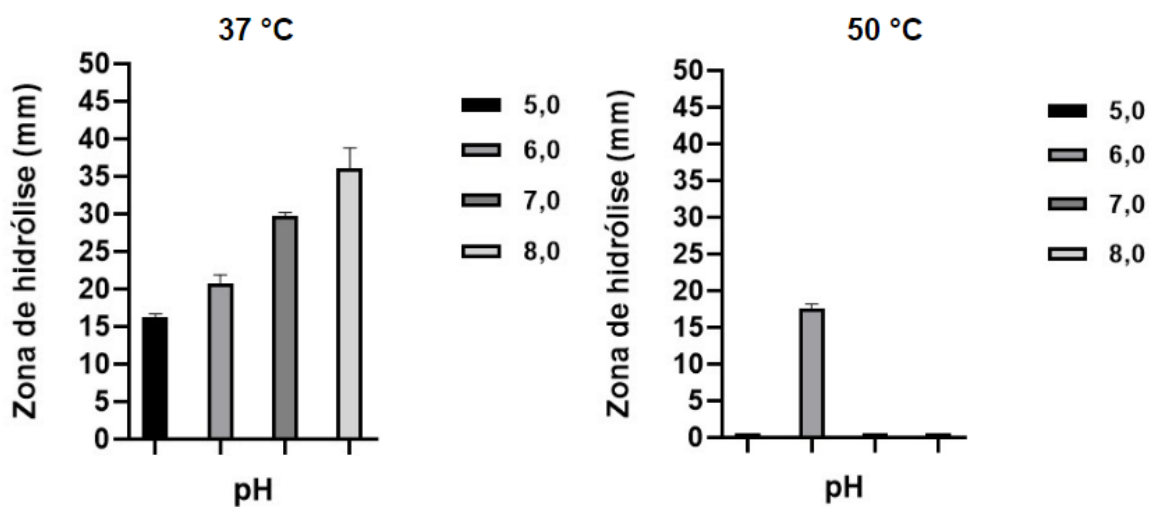
Entre os isolados testados o *P. stutzeri* NC2 se destacou por apresentar maior índice enzimático (14,15), o qual foi observado para celulases (Tabela 3). Sendo assim, esse isolado mostrou-se mais promissor para a produção de celulases e foi selecionado para realizar os testes do efeito do pH, temperatura e salinidade na atividade enzimática.

##### **5.4.1 INFLUÊNCIA DO pH, TEMPERATURA E SALINIDADE NA ATIVIDADE CELULOLÍTICA**

Os ensaios realizados a partir do sobrenadante a fim de verificar a influência do pH e da temperatura da celulase estão ilustradas na Figura 20. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que a redução do valor do pH promoveu uma redução gradual do tamanho do halo em pH 5,0 a enzima diminuiu cerca de 55,6% da sua atividade. Portanto podemos supor que as celulases produzidas por isolado *P. stutzeri* NC2 possui maior atividade em pH alcalino (Figura 20).

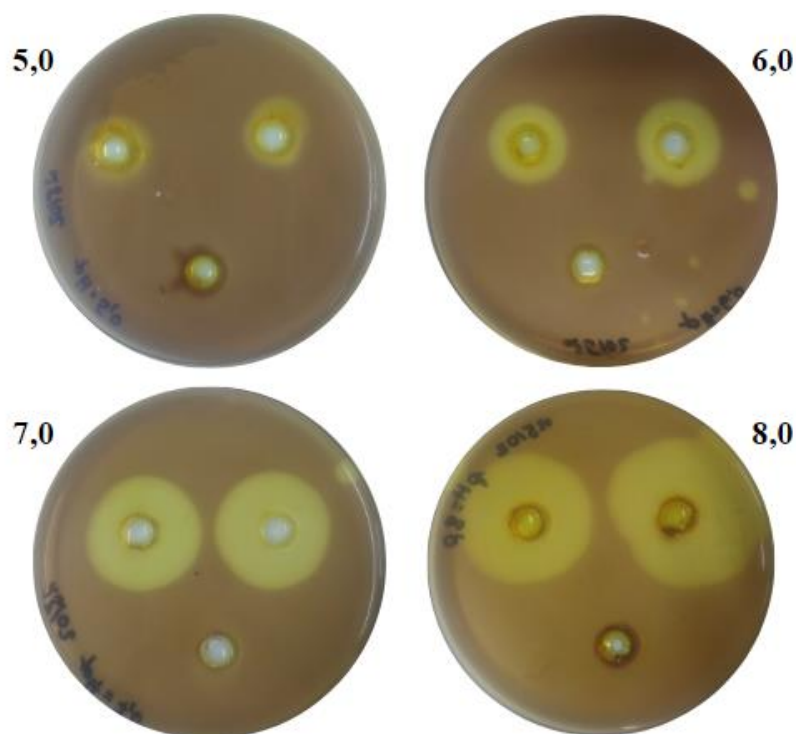
Goel et al. (2019) verificaram que o pH ótimo para a atividade de uma celulase produzida por *Pseudomonas* foi pH 7,0, embora a enzima foi estável em uma ampla faixa de valores de pH, sendo ideal o pH 7,0 no qual se aproxima dos resultados encontrados no presente trabalho.

Figura 20. Efeito do pH e temperatura na atividade celulolítica do sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo do isolado *P. stutzeri* NC2



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Figura 21. Halos de hidrólise de CMC após 24h de incubação do sobrenadante livre de células (*P. stutzeri* NC2) a 37°C em diferentes pH



Fonte: Autoria Própria, 2020.

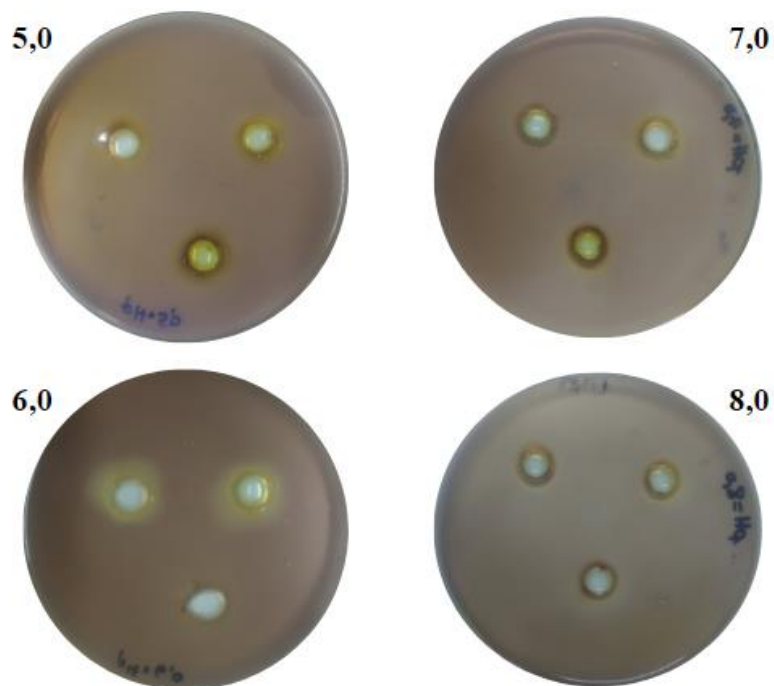
Já Irfan e colaboradores (2012), identificaram que o pH ideal para a atividade da endoglucanase foi 7,5 e a enzima foi estável entre pH 6,5 a 9,5, sendo que o aumento ou diminuição do pH resultou em declínio na atividade enzimática. O estudo realizado

Khatiwada et al. (2016) analisaram os efeitos do pH na atividade da celulase variando de 4,0 a 9,0. A atividade máxima da celulase foi em pH 7, com a diminuição significativa tanto quando submetida ao pH ácido quanto ao neutro-alkalino. A atividade da celulase foi significativamente inibida em pH 6,0 ou acima de pH 9,0.

Conforme os dados obtidos neste trabalho e dados da literatura foi possível observar que vários isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* tendem a produzir enzimas celulolíticas de caráter neutro-alkalino. Entretanto, outros trabalhos como o de Ire & Berebon (2016) determinaram o pH 6,5 como pH ótimo para endoglucanase produzida por *P. aeruginosa*. Essa enzima foi estável em uma faixa estreita de pH (5,5 a 6,5) diferenciando-se dos resultados obtidos por Irfan et al. (2012), Khatiwada et al. (2016) e Goel et al. (2019).

Em relação a influência da temperatura, foi observado neste trabalho que apenas nas condições de pH= 6,0 e temperatura 50 °C a atividade celulolítica foi observada (Figura 22). A literatura demonstra que as celulases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam uma temperatura ideal de atividade em 40°C, 50°C e 60°C. (IRFAN et al., 2012; KHATIWADA et al. 2016; IRE & BERE BON, 2016; GOEL et al.,2019). As celulases obtidas de outros isolados de bactérias apresentam faixas de temperatura e pH semelhantes: *Bacillus* sp. 50°C e pH 6,0 (PAUDEL & QIN, 2015), *Stenotrophomonas maltophilia* 50°C e pH 8,0 (TAMILANBAN et al., 2017) e *B. pumilus* EB3 60°C e pH 6,0 (ARIFFIN et al., 2006).

Figura 22. Halos de hidrólise de CMC após 24h de incubação do sobrenadante livre de células (*P. stutzeri* NC2) a 50°C em diferentes pH

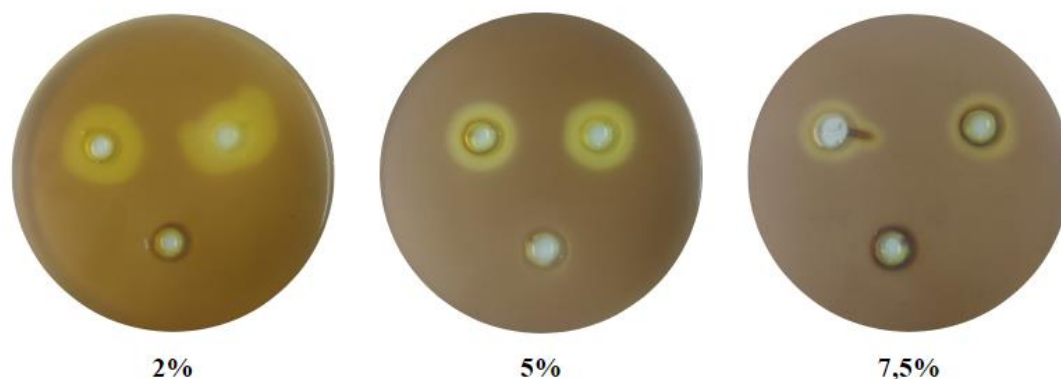


Fonte: Autoria Própria, 2020.

Após a identificação das melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática, a enzima foi submetida ao teste de salinidade tendo em vista a característica halotolerante do isolado *P. stutzeri* NC2. As bactérias halotolerantes ou halófilas demonstram potencial na bioprospecção de novas enzimas, que não são apenas estáveis a concentrações mais altas de sal, mas também a pH mais alcalinos e em alguns casos tolerantes a solventes (KUMAR et al., 2012).



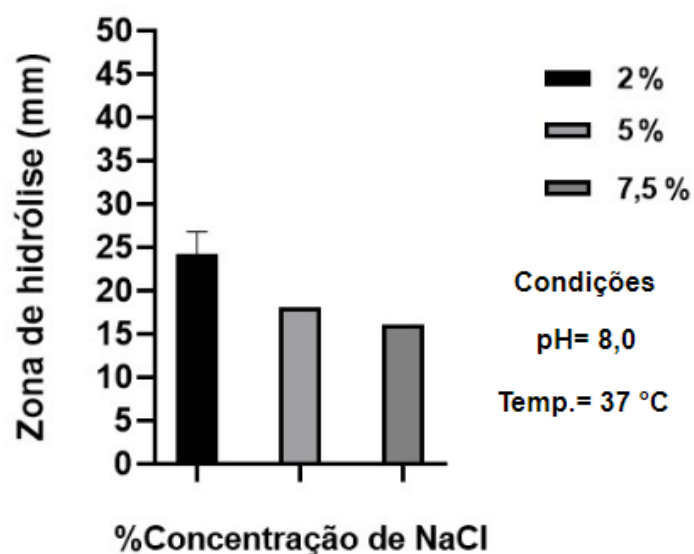
Figura 23. Halos de hidrólise após 24h de incubação do sobrenadante livre de células (*P. stutzeri* NC2) a 37°C em pH 8,0 em diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os halos de hidrólise de CMC obtidos a partir da incubação do sobrenadante em meios com concentrações de NaCl de 2%, 5% e 7,5% pode ser visualizado na Figura 23. O tamanho do halo no pH 8,0 a 37°C foi reduzido cerca de 34% quando a enzima foi submetida a salinidade de 2% (m/v) de NaCl. Já nas concentrações 5% e 7,5% (m/v) de NaCl o tamanho do halo foi reduzido de 50% e 56% respectivamente, comparado a melhor condição (pH 8,0 a 37°C) que seria 100%. A Figura 24 mostra a relação da salinidade e o tamanho do halo (mm) do teste de salinidade.

Figura 24. Efeito da salinidade na atividade celulolítica do sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo do isolado *P. stutzeri* NC2



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os resultados obtidos demonstram que a enzima possui certa tolerância a concentração salina. A celulase alcali-halotolerante de *B. flexus* produzida permaneceu com 70% de sua atividade na concentração de 15% de NaCl e reduziu para 18% quando na concentração de sal mais alta (21%), demonstrando também, tolerância a pH muito alto (TRIVEDI et al., 2011) Santos (2016), verificou que o isolado marinho *Bacillus* sp. capaz de produzir celulase, na qual apresentou uma atividade residual de mais de 70% mesmo após exposição a 1.5M de NaCl que são aproximadamente 8-9% (m/v) de NaCl no meio. Já a enzima produzida pelo isolado *B. sonorensis* HSC7 foi ativo em diferentes concentrações de NaCl (0-30%) e a maior atividade foi observada em 10% NaCl. Verificou-se também que esta enzima permaneceu com 57% de sua atividade a 30% NaCl (AZADIAN et al., 2017).

Com tudo, é notável que as enzimas que apresentam tais características se destacam e agregam a indústria, suprimindo as necessidades e anseios atuais do mercado. Enzimas termoestáveis, alcalino/ácido tolerantes, halotolerantes e estáveis frente a solventes, permitem a aplicação destas em várias área e setores industriais como na conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustível, polpa de papel, couro, têxteis, incorporação em detergentes e quaisquer outras funcionalidade que possam exigir condições mais extremas (TRIVEDI et al., 2011; AZADIAN et al., 2017).

## 6. CONCLUSÕES

1. Com base nos resultados obtidos a partir da identificação molecular conclui-se que 9 dos 13 isolados pertencem ao filo Firmicutes, 2 ao filo Actinobacteria e 2 ao filo Proteobacteria;
2. O padrão de crescimento de bactérias em diferentes concentrações de NaCl revelou que todos os isolados são halotolerantes, com destaque ao isolado *Bacillus* sp. N1 no qual demonstrou ser halófilo moderado;
3. Todos os isolados analisados produziram ao menos uma das enzimas avaliadas: proteases, celulasas e lipases, sendo que o isolado *B. subtilis* NC8 foi o único capaz de produzir as três enzimas;
4. O isolado *P. stutzeri* NC2 apresentou o maior índice enzimático para celulase dentre as enzimas estudadas;
5. A melhor condição de pH e temperatura para a celulase produzida por *P. stutzeri* NC2 foi de 8,0 à 37°C. Sob o efeito da salinidade, a concentração de 2% foi a melhor. A enzima demonstrou ter atividade até a concentração máxima de NaCl testada (7,5%) apresentando um caráter halotolerante.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. Disease in Zoanthids: dynamics in space and time. **Hydrobiologia**, v. 460, p. 113-130, 2001.
- AGUILAR, J.G.S.; SATO, H.H. Microbial proteases: Production and application in obtaining proteinhydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- ALJOHNY, B.O. Halophilic Bacterium - A review of new studies. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. 3, p. 2061-2069, 2015.
- AMORIM, T.P.L.; COSTA, C. F.; SASSI, R. Branqueamento e doenças em Cnidários dos recifes costeiros de Picãozinho, Nordeste do Brasil. **Tropical Oceanography**, v. 40, p. 185-201, 2012.
- ARAÚJO, Gilmara Henriques. **Caracterização bacteriológica da água do mar e diversidade de bactérias cultiváveis associadas ao coral *Siderastrea stellata* nos recifes costeiros de Cabo Branco, João Pessoa-PB**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba - UFPB. João Pessoa, PB. 2013.
- ARIFFIN, H.; ABDULLAH, H.; UMI KALSOM, M.S.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A. Production and characterisation of cellulase by *Bacillus*. 2006. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/profile/Hidayah\\_Ariffin/publication/287118368\\_Production\\_and\\_characterization\\_of\\_cellulase\\_by\\_Bacillus\\_pumilus\\_EB3/links/5593466d08ae1e9cb4299397.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hidayah_Ariffin/publication/287118368_Production_and_characterization_of_cellulase_by_Bacillus_pumilus_EB3/links/5593466d08ae1e9cb4299397.pdf)>Acesso em: 22 de jan de 2020.
- ARUL, D.; BALASUBRAMANI, G.;BALASUBRAMANIAN, V.; NATARAJAN, T.; PERUMAL, P. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles and ethyl acetate metabolites of the potent halophilic (marine) bacterium, *Bacillus cereus* A30 on multidrug resistant bacteria. **Pathogens and Global Health**, v. 111, n. 7, p. 367-382, 2017.
- AZADIAN, F.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z.; HASSANSHAHIAN, M.. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, n. 5, p. 187-196, 2017.
- BARRETT AJ, RAWLINGS ND, WOESSNER JF. (eds). 2004. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2nd edition, Academic Press, London.
- BEN BACHA A.; MOUBAYED, N.M.; AL-ASSAF, A. An organic solvent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* ALA1 strain with potential for use as an

industrial biocatalyst. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 378-90, 2016.

BORKAR, P.S. Purification and immobilization of thermostable serine alkaline protease from *Bacillus subtilis*. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 5, p. 622-626, 2018.

BORRELLI, G.M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 2015, n. 16, p. 20774-20840, 2015.

BOSE, A.; CHAUDHARY, V.; KEHARIA, H.; SUBAMANIAN, R.B. Production and characterization of a solvent-tolerant protease from a novel marine isolate *Bacillus tequilensis* P15. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 343-354, 2014.

BOSE, R.B.; THILLAICHIDAMBARAM, M.; PAULRAJ, B.; NARAYANAN, K.; GANESAN, N.; MUTHIAH, R.C.; MURUGESAN, R.K. Bio-decolourization of Reactive Blue EFAF using halotolerant *Exiguobacterium profundum* strain CMR2 isolated from salt pan. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.16, p. 98-106, 2018.

CAMPOS, Felipe Ferreira. **Diversidade de Bactérias associadas ao muco do zoantideo palythoa caribaeorum (CNIDARIA, ANTHOZOA) do litoral sul de Pernambuco**. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) Programa de pós graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Vitória do Santo Antão. PE. 2011.

CARLOS, C.; TORRES, T.T.; OTTOBONI, L.M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, n. 3, p. 16-24, 2013.

CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. Lipases: An Overview. **Methods in Molecular Biology**. v. 1835, p. 3-38, 2018.

CHEN, Y.G.; TANG, S.K.; ZHANG, Y.Q.; LI, Z.Y.; YI, L.B.; WANG, Y.X.; LI, W.J.; CUI, X.L. *Arthrobacter halodurans* sp. nov., a new halotolerant bacterium isolated from sea water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 1, p. 63-67, 2009.

CONTESINI, F.J.; MELO, R.R.; SATO, H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, v. 3, p.321-334, 2018.

DAOUD, L.; KAMOUN, J.; ALI, M.B.; JALLOULI, R.; BRADAI, R.; MECHICHI, T.; GARGOURI, Y.; ALI, Y.B.; ALOULOU, A. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International Journal of Biol Macromol**, v. 57, p. 232–237, 2013.

de VERAS, B.O.; dos SANTOS, Y.Q.; DINIZ, K.M.; CARELLI, G.S.C.; dos SANTOS, E.A. Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60 [version 1; peer review: 1 approved with reservations]. **F1000Research**. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16542.1>. 2018.

DUNPHY, C. M.; GOUHIER, T. C.; CHU.; N. D.; VOLLMER, S. V. Structure and stability of the coral microbiome in space and time. **Scientific Reports**, n. 9, p. 1-18, 2019.

FERRAZ, J.L.A.A.; SOUZA, L.; O.; SILVA, T.P.; FRANCO, M. Obtenção de lipases microbianas: Uma breve revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [v. 20, n. 1](#), p. 30-54, 2018.

GAUR, R.; TIWARI, S.; SHARMA, A. Isolation and Characterization of Thermotolerant Alkaline Serine Protease of *Bacillus* sp. P-02. **American Journal of Food Technology**, v. 9, n. 5, p. 246-56, 2014.

GOEL, N.; PATRA, R.; VERMA, S.K; SHARMA, P.C. Purification and characterization of cellulase from *Pseudomonas* sp. isolated from waste dumping site soil. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 9, n. 6, p. 118–124, 2019.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUPTA, P.K.; RAGHUNATH, S.S.; PRASANNA, D.V.; VENKAT, P.; SHREE, V.; CHITHANANTHI, C.; CHOUDHARY, S.; SURENDER, K.; GEETHA, K. An update on overview of cellulose, its structure and applications. **IntechOpen**. DOI: 10.5772/intechopen.84727. 2019.

GURUMALLESH, P.; ALAGUBASKAR, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMYET, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

GVR - Grand View Research. **Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases), By Application (Industrial, Specialty), By End Use, By Region, And Segment Forecasts, 2019 - 2025**. Grand View Research, San Francisco, jun. 2019. Disponível em:

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 18 jan. 2020.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 1, p. 597-607, 1975.

HASSAN, S.W.M.; ABD, E.L.; LATIF, H.H.; ALI, S.M. Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* HSS: application in wastewater treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2377, p. 1-13, 2018.

HERNANDEZ-AGREDA, A.; LEGGAT, W.; BONGAERTS, P.; AINSWORTH, T.D. The Microbial Signature Provides Insight into the Mechanistic Basis of Coral Success across Reef Habitats. **American Society Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2016.

IMBS, A.B. Fatty Acids and Other Lipids of Corals: Composition, Distribution, and Biosynthesis. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 39, n. 3. p. 153-68, 2013.

IRE, F.S.; BEREBOON, P.D. Production and characterization of crude 1, 4 -  $\beta$  - endoglucanase by *Pseudomonas aeruginosa* using corn (*Zea mays*) cobs and pawpaw (*Carica papaya*) fibres as substrates. **Journal of Advances in Biology and Biotechnology**, v. 8, n. 4, 2016

IRFAN, M.; SAFDAR, A.; SYED, Q.; NADEEM, M. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. **Türk Biyokimya Dergisi / Turkish Journal of Biochemistry**, v. 37, n. 3, p 120-128, 2012.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. 2019. Disponível em:<<https://www.intechopen.com/books/cellulose/microbial-cellulases-an-overview-and-applications>>Acesso em 10 de Mar de 2020.

KALWASIŃSKA, A. JANKIEWICZ, U.; FELFÖLDI, T.; BURKOWSKA-BUT, A.; BRZEZINSKA, M.S. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 4, p. 553-561, 2018.

KHATIWADA, P., AHMED, J., SOHAG, M. H., ISLAM, K.; AZAD, A. K.. Isolation, screening and characterization of cellulase producing bacterial isolates from municipal solid wastes and rice straw wastes. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 6, n. 4. p. 2-5, 2016.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1 , p. 211-213, 1987.

KUMAR, S.; KARAN, R.; KAPOOR, S.; SINGH, S.P.; KHARE, S.K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p.1595-1603, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and Evolution**, v. 35 n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LEE, J. M.; KIM Y. R.; KIM J. K.; JEONG G. T.; HA J. C.; KONG, I. S. Characterization of salt-tolerant b-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1335–1346, 2015.

LEE, J.S.; LEE, K.C.; PYUN, Y.R.; BAE, K.S. *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1277-1280, 2003.

LI, X. L.; GONG, J.; HU, Y.; CAI, L.; JOHNSTONE, L.; GRASS, G.; RENSING, C.; WANG, G. Genome sequence of the moderately halotolerant, arsenite-oxidizing bacterium *Pseudomonas stutzeri* TS44. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16. p. 4473-4, 2012.

LIMA, R.N.; PORTO, A.L. Recent advances in marine enzymes for biotechnological processes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, n. 1, p. 153-192, 2016.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P.. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MOHAPATRA, R.K; PARHI, P.K.; THATOI, H.; PANDA, C.R. Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India. **Chemistry and Ecology**, v. 33, n. 2, p. 114-130, 2017.

MATOS, Fernanda Brocca. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho**. 63 f. 2012. Dissertação (Mestrado) Programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS. 2012.

MCDONALD, J.K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms, aspects related to nomenclature and classification. **Histochemical Journal**, v. 17, p. 773-785, 1985.



MELO, Liany Figuerêdo de Andrade. **Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil.** 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco -UFPE. Recife, PE. 2017.

MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 163-182, 2015.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V M. G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32. n. 2. p. 213-234, 2011.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 5, n. 3, p. 9-24, 2009.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. 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**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. ed. 6. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NERURKAR, M.; JOSHI, M. PARITI, S.; ADIVAREKAR, R. Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, p. 435-443, 2013.

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. Why is the ocean salty? **National Ocean Service website**, Estados Unidos, jun. 2018. Disponível em: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/whysalty.html>. Acesso: 15 jan. 2019.

OLIVEIRA, L.C.; RAMOS, P.L.; MAREM, A.; KONDO, M.Y.; ROCHA, R.C.; BERTOLINI, T.; et al. Halotolerant bacteria in the Sao Paulo Zoo composting process and their hydrolases and bioproducts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 347-354, 2015.

PANCHAPAKESAN, A.; SHANKAR, N. Fungal Cellulases: An Overview. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. DOI: 10.1016/B978-0-444-63507-5.00002-2. 2016.

PANT, G.; PRAKASH A.; PAVANI ,J.V.P; BERA S.; DEVIRAM, G.V.N.S.; KUMAR, A.; PANCHPURI, M.; PRASUNA, R.G. Production, optimization and partial

purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.

PARWATA, P.; ASYARI, M.; HERTADI, R. Organic solvent-stable lipase from moderate halophilic bacteria *Pseudomonas stutzeri* isolated from the Mud Crater of Bledug Kuwu, Central Java, Indonesia. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 31-40, 2014.

PAUDEL, Y.P.; QIN, W. Characterization of novel cellulase-producing bacteria isolated from rotting wood samples. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 117, p. 1186-96, 2015.

PAULINO, Gustavo Vasconcelos Bastos. **Diversidade de bactérias não cultiváveis associadas ao zoantídeo *Palythoa caribaeorum***. 57 f. 2017. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciência Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, UFAL. Maceió, AL. 2017.

PECHENIK, J.A. **Biologia dos invertebrados**. 7. ed. Porto Alegre : AMGH, 2016.

PEREIRA, Jalcinês da Costa. **Atividade antimicrobiana das bactérias isoladas do tecido dos cnidários dos recifes costeiros da Paraíba**. 2020. 62 f Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, UFPB. João Pessoa, PB 2020.

PEREIRA, L.B.; PALERMO, B.R.; CARLOS, C.; OTTOBONI, L.M. Diversity and antimicrobial activity of bacteria isolated from different Brazilian coral species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 16. p. 1-8, 2017.

PINILLA, Maria Paula Parada. **Caracterização de bactérias halotolerantes isoladas do bioma caatinga e avaliação da produção de biopolímeros**. 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, USP. São Paulo, 2016.

PITA, L.; RIX, L.; SLABY, B.M.; FRANKE, A.; HENTSCHEL, U. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 6-45, 2018.

RABELO, Emanuelle Fontenele. **Diversidade de micro-organismos associados a zoantídeos (Cnidaria, Zoanthidae)**. 2012. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará-UFCE. Fortaleza, CE. 2012.

RAMLATH, L.; KEERTHANA, P.P.; SAFVANA FATHIMA, P.; MASHHOOR, K. Bacteria from Coral Ecosystem of Kiltan Island, Lakshadweep: Resource for Hydrolytic Enzymes. **International Journal of Cell Science and Biotechnology**, v. 7, 2018.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRA, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 110, p. 365-74, 2019.

SADHU, S.; MAITI, T. K.; Cellulase production by bacteria: A review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235-258, 2013.

SAGGU, S.K.; MISHRA, P.C. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 1-18, 2017.

SANGEETHA. R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. **Research Journal of Microbiology**, v. 6. n. 1, p. 1-24, 2011.

SANTOS, Yago Queiroz dos. **Produção, purificação e caracterização de uma celulase termoestável e halotolerante de uma linhagem marinha de Bacillus sp.** 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN. Natal, RN. 2016.

SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B.L.; GUPTA, S. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. **ISRN Biotechnology**. 2013. Disponível em:<<http://downloads.hindawi.com/journals/isrn.biotechnology/2013/985685.pdf>> Acesso em 20 de Jan de 2020.

SHARMA, A.; TEWARI. R., RANA, S. S.; SONI, R., SONI, S.K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 179, v. 8. p. 1346-80, 2016.

SILVA, Roberta Mayrielle Souza da. **Diversidade de bactérias cultiváveis associadas às colônias sadias e necrosadas do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) dos recifes costeiros de Carapibus, Paraíba.** 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SINGH, S.K.; TRIPATHI, V.R.; JAIN, R.K.; VIKRAM, S.; GARG, S.K. An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 59, p.1-7, 2010.

SMIBERT, R.; KRIEG, N.R. Phenotypic characterization. *In*: GERHARDT, P. et al. (eds.). **Methods for general and molecular bacteriology**, Washington: ASM Press, 1994.

SOARES, C.L.S.; PÉREZ, C.D.; MAIA, M.B.S.; SILVA, R.S.; MELO, L.F.A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006.

SUTHERLAND, K.P.; PORTER, J.W.; TORRES, C. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. **Marine Ecology Progress**, v. 266, p. 273-302, 2004.

SHANKAR, T.; ISAIARASU, L. Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. **Middle-East Journal of Scientific Research**, n. 8, v. 1, p. 40-45, 2011.

TAMILANBAN, R.; EBENEZER, S.; VELAYUDHAN, S.S.; HARSHAVARDHAN, S. Purification and characterization of an extracellular cellulase produced using alkali pretreated rice straw by *Stenotrophomonas maltophilia*. **International Journal of Biology Research**. v. 2, n. 4, p. 45-54, 2017.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo red - polysaccharide interaction in enumeration of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TIWARI, R.; SINGH, P.K. PAWAN K. S.; NAIN. L.; SHUKL, P. Bioprospecting of novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v.10, n. 24, p. 2-18, 2017.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 891-897, 2011.

UDDIN, M.E., AHMAD, T.; MONIRUZZAMAN, M.; RAY, S.K.; AHAMMED, T. Thermotolerant extracellular proteases produced by *B. subtilis* isolated from local soil that representing industrial applications. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 733-741, 2017.

XUE, D.; ZENG, X.; GONG, C.; LIN, D.; YAO, S. Cold adapt and ethanol tolerant endoglucanase from a marine *Bacillus subtilis*. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 12, p. 2601-2606, 2018.