

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

YAGO QUEIROZ DOS SANTOS

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIBACTERIANA DAS BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES DE CABO BRANCO,
PARAÍBA**

**JOÃO PESSOA
2014**

YAGO QUEIROZ DOS SANTOS

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIBACTERIANA DAS BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES DE CABO BRANCO,
PARAÍBA**

Monografia apresentada em
cumprimento das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas na Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof.^a Dra. Krystyna Gorlach-Lira

**JOÃO PESSOA
2014**

YAGO QUEIROZ DOS SANTOS

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIBACTERIANA DAS BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES DE CABO BRANCO,
PARAÍBA**

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Krystyna Gorlach-Lira
(Orientadora) Depto. Biologia Molecular / CCEN / UFPB – Campus I

Prof.^a Dra. Creusione Figueiredo dos Santos
(Examinadora) Depto. Biologia Molecular / CCEN / UFPB – Campus I

Prof. Dr. Rómulo Marino Llamoca Zárate
(Examinador) Depto. Biologia Molecular / CCEN / UFPB – Campus I

**JOÃO PESSOA
2014**

A Nosso Senhor sacramentado,
À Virgem Santíssima, auxílio dos cristãos,
E ao Papa Bento XVI

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Uno e Trino, Causa não causada de todas as causas, pela força e capacidade intelectual de meu ser sem a qual me teria sido impossível a execução deste trabalho.

À Edilene Lúcia Tavares de Queiroz e Francisco de Assis dos Santos, meus queridos pais, pelo dom da vida, amor e constância incondicional do apoio que sempre me dedicaram.

À memória dos meus antepassados, cujo exemplo e honradez me serviram de alicerce sólido através do qual pude trilhar rumo ao meu objetivo.

Aos meus Professores de ontem, de hoje e de sempre – na pessoa da Professora Helena: mestra das primeiras letras – sem os quais não me teria sido possível chegar até aqui.

À Professora Doutora Krystyna Gorlach-Lira, minha orientadora, pela paciência e proficiência com a qual – imprescindivelmente – me auxiliou neste trabalho.

À Professora Doutora Creusione Figueiredo dos Santos, pelos ensinamentos e pelo pioneirismo em instruir-me seja nos experimentos no laboratório ou na vivência didática da monitoria.

Ao Professor Doutor Rómulo Marino Llamoca Zárate, pelas contribuições valiosas e experiência compartilhada.

Aos colegas de laboratório do LEBIM e BIOMICRO, pelo agradável convívio e excelente oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos inolvidáveis colegas de turma e de curso, pela convivência nestes anos de graduação em que – juntamente com os professores – foram capazes de ensinar e marcar, indelevelmente, a minha formação.

A todos e todas que de alguma forma marcaram, contribuíram e, assim, são também – merecidamente – partícipes neste trabalho.

RESUMO

O ambiente marinho constitui uma complexa rede de interação de microrganismos com demais espécies aquáticas. Nos últimos anos este intrincado tipo de relação passou a ser objeto de diversos estudos com especial foco nas variadas moléculas de origem bacteriana secretadas, dentre as quais, as enzimas por desempenharem importante papel nas relações ecológicas influenciando o crescimento de organismos no entorno do hospedeiro ao qual estas bactérias estão associadas. Além do papel ecológico, a atividade enzimática possui alto interesse biotecnológico e variado emprego nos processos industriais. Este trabalho teve como objetivo a caracterização da atividade enzimática e antibacteriana dos isolados de bactérias obtidos de tecidos do coral *Siderastrea stellata* sadio e com pigmentação alterada (roxa) nos recifes de Cabo Branco, Paraíba. Os isolados foram avaliados com relação à atividade proteolítica, amilolítica, lipolítica e celulolítica extracelular, bem como à capacidade antagonística frente à linhagem *Vibrio harvey*, espécie potencialmente patogênica aos corais. Das 69 linhagens estudadas, 10 linhagens foram celulolíticas e consistiam de bastonetes Gram +, com endósporos, bastonetes Gram +, sem endósporos e bactérias filamentosas; a atividade proteolítica foi observada em 22 linhagens, as quais eram constituídas de bastonetes Gram + e de Cocos Gram +, sem endósporos. Condições ótimas de temperatura e pH foram avaliadas para cultivo das linhagens por meio de espectrofotometria onde se constatou melhor crescimento na faixa do pH acima de sete sendo escolhido o pH 7,2 para os testes de incubação, por meio de SDS-PAGE 12,5% foi possível observar a existência de proteínas extracelulares nos sobrenadantes das culturas estudadas na faixa de 30-40 kDa. Além dos dados relativos à atividade enzimática, a linhagem SR09 demonstrou atividade antagônica frente à espécie *Vibrio harvey*.

Palavras-chave: *Siderastrea stellata*, bactérias, enzimas, celulasas, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The marine environment is a complex network of interaction of microorganisms with other aquatic species. In recent years this intricate kind of relationship became the subject of several studies with special focus on the various bacterial secreted molecules, among which the enzymes for its important role in ecological relationships influencing the growth of organisms in the vicinity of the host to which these microorganisms are associated. Besides the ecological role, the enzyme activity has high biotechnological interest and varied employment in industrial processes. This study aimed to characterize the enzymatic and antibacterial activity of bacterial isolates obtained from coral tissues of healthy and altered pigmentation (purple) colonies of *Siderastrea stellata* in Cabo Branco reefs, Paraíba. The isolates were evaluated with respect to its proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic extracellular activity as well as the antagonistic ability against one isolate of the bacteria *Vibrio harvey* a potentially coral pathogenic specie. Of the 69 studied strains, 10 strains were cellulolytic and consisted of Gram + with endospores, Gram + without endospores and filamentous bacteria; proteolytic activity was observed in 22 strains, which were composed of Gram + and Gram + Coco without endospores. Optimum temperature and pH were evaluated for cultivation of strains by spectrophotometry which demonstrated better growth in the pH range above seven, therefore pH 7.2 was chosen for incubation tests. It was observed by SDS-PAGE 12.5 % the existence of extracellular proteins in the supernatants of the studied cultures in the 30-40 kDa range. In addition to the enzymatic activity data, the SR09 strain showed antagonistic activity against the studied *Vibrio harvey* strain.

Keywords: *Siderastrea stellata*, bacteria, enzymes, celulasas, antibacterial activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Recifes costeiros da Ponta do Seixas, João Pessoa–PB. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.....**25**
- Figura 2.** Falésia da Ponta do Seixas, João Pessoa–PB. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.....**25**
- Figura 3.** Aspecto macroscópico do coral *Siderastrea stellata* sadio. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.....**25**
- Figura 4.** Aspecto macroscópico do coral *Siderastrea stellata* com sinais de mudança na pigmentação natural. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.....**25**
- Figura 5.** Aspectos do teste de atividade celulolítica: a) resultado negativo (não há a formação de halo); b) resultado positivo demonstrando degradação do substrato ao redor da colônia (embora não significativa para fins de prospecção; c) resultado positivo com halo bem evidente de diâmetro superior a 3 cm.....**32**
- Figura 6.** Aspectos do teste de atividade proteolítica: a) resultado negativo (sem formação de halo); b) resultado positivo demonstrando degradação tênue do substrato ao redor da colônia (halos médios de 1cm de diâmetro); c) resultado positivo com halos conspícuos de diâmetro superior a 3 cm de diâmetro.....**32**
- Figura 7.** Atividade amilolítica de linhagens isoladas do coral *S. stellata*.....**35**
- Figura 8.** Atividade lipolítica de linhagens isoladas do coral *S. stellata*.....**35**
- Figura 9.** Aspectos do teste de antagonismo bacteriano: a) Resultado negativo (não há inibição da linhagem *V. harvey*); b) Resultado positivo (inibição do crescimento de *V. harvey* pela linhagem SR09); c) Detalhe do crescimento da linhagem SR09 e do halo de inibição do crescimento de *V. harvey* em seu entorno.....**36**
- Figura 10.** Eletroforese vertical em poliacrilamida 12,5%. 01 – Padrão de Peso Molecular; 02, 05 e 08 – Extrato proteico obtido a partir do lisado celular originário do cultivo em Caldo Marinho da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente; 03, 06 e 09 – Extrato proteico obtido a partir do lisado celular originário do cultivo em CMC da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente; 04, 07 e 10 – Conteúdo proteico do sobrenadante do meio CMC da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente.....**45**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biótipos das linhagens bacterianas isoladas do coral <i>Siderastrea stellata</i> sadio.....	24
Tabela 2. Biótipos das linhagens bacterianas isoladas do coral <i>Siderastrea stellata</i> com pigmentação alterada (roxa).....	24
Tabela 3. Atividade proteolítica e celulolítica de enzimas extracelulares secretadas por bactérias associadas a corais de <i>S. stellata</i>	32

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Avaliação do crescimento da linhagens SR05, SS09b, SS18, SR22 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs....**37**
- Gráfico 2.** Avaliação do crescimento das linhagens SS25, SR31, SR41, SR44 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs....**38**
- Gráfico 3.** Avaliação do crescimento das linhagens SR60, SR61 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs.....**38**
- Gráfico 4.** Avaliação do crescimento das linhagens SR05, SR31 e SR41 por espectrofotometria a 600nm durante quatro dias em meio CMC com pH 7,2.....**39**
- Gráfico 5.** Curva padrão para a dosagem de açúcares redutores a partir de concentração de D-Glicose, utilizando-se a metodologia de Miller.....**39**
- Gráfico 6.** Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR05 ao longo de 120 horas.....**40**
- Gráfico 7.** Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR31 ao longo de 120 horas.....**40**
- Gráfico 8.** Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR41 ao longo de 120 horas.**41**
- Gráfico 9.** Curva padrão para a dosagem de proteínas solúveis totais a partir de concentrações de BSA, utilizando-se a metodologia de Bradford.....**42**
- Gráfico 10.** Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR05 ao longo de 120 horas.....**42**
- Gráfico 11.** Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR31 ao longo de 120 horas.....**43**
- Gráfico 12.** Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR41 ao longo de 120 horas.....**43**
- Gráfico 13.** Dosagem dos açúcares redutores totais liberados após reação dos extratos enzimáticos extracelulares das linhagens SR05, SR31 e SR41 em diferentes pHs com uma solução de CMC a 4% a 50 °C por 10 minutos.....**44**

LISTA DE ABREVIATURAS

rRNA 16S – Subunidade do RNA Ribossomal 16S

µm – micrometro

pH - Potencial Hidrogeniônico

°C – Graus Celsius

CMC – Carboximetilcelulose

SS – Linhagens bacterianas isoladas do coral *Siderastrea stellata* sadio

SR - Linhagens bacterianas isoladas do coral *Siderastrea stellata* com alteração na pigmentação

mL – Mililitro

µL – Microlitro

TCBS - Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose Ágar

h - Hora

g - Grama

rpm – Rotações Por Minuto

DNS - Ácido 3 5-dinitrosalicílico

BSA – Albumina Sérica Bovina

mM - Milimolar

nm - Nanômetro

mg - Miligrama

µg - Micrograma

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Os Recifes de Corais.....	14
1.2 Microrganismos Associados aos Corais Escleractíneos.....	15
1.3 Enzimas Extracelulares Bacterianas.....	17
1.3.1 Proteases.....	18
1.3.2 Celulases.....	18
1.3.3 Amilases.....	18
1.3.4 Lipases.....	19
1.4 Moléculas Microbianas com Atividade Bactericida.....	19
1.5 Caracterização dos Microrganismos.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Coleta e Caracterização das Linhagens Bacterianas.....	23
3.2 Detecção da Atividade Enzimática Extracelular em Meio Sólido.....	26
3.2.1 Atividade Proteolítica.....	26
3.2.2 Atividade Celulolítica.....	26
3.2.3 Atividade Amilolítica.....	27
3.2.4 Atividade Lipolítica.....	27
3.3 Avaliação do Crescimento Bacteriano.....	27
3.4 Avaliação da Produção de Celulases em Meio Líquido.....	27
3.4.2 Dosagem de Açúcares Redutores Totais.....	28
3.4.3 Quantificação de Proteínas Solúveis Totais.....	28
3.4.4 Avaliação do pH ótimo para a atividade celulolítica.....	29
3.5 Atividade Antagonística das Bactérias Isoladas do Coral de <i>S. stellata</i> com Pigmentação Alterada.....	29
3.6 Análise do Perfil Proteico das Linhagens Celulolíticas.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Caracterização Morfofisiológica das Linhagens Isoladas.....	31
4.2 Atividade Enzimática Extracelular em Meio Sólido.....	31
4.3 Atividade Antagonística de Bactérias.....	36
4.4 Avaliação do Crescimento das Linhagens sob Diferentes Condições.....	37
4.5 Quantificação de Carboidratos e Análise Proteômica.....	39

4.6 Peril Proteico do Sobrenadante do Cultivo de Linhagens Celulolíticas.....	44
5 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXO.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Recifes de Corais

O ambiente marinho comporta uma plêiade de microrganismos que constituem um complexo e intricado sistema de relações ecológicas com os demais elementos da biota, dentre os quais, destacam-se os corais escleractíneos. Os recifes de corais estão entre as maiores estruturas compostas por organismos vivos do planeta (ROSENBERG et al., 2007), comportando uma vasta gama de organismos associados, comparável, em termos de riqueza de espécies, com as florestas úmidas (SEBENS, 1994) e com um valor econômico – associado às práticas de pesca em seu entorno, turismo ambiental, proteção às regiões costeiras por suavizar a força mecânica das ondas, dentre outras – estimado em mais de 370 bilhões de dólares por ano em todo mundo (CONSTANZA et al., 1997). Nos últimos anos, têm-se relatado a alta diversidade de microrganismos associados aos corais, destacando-se os procariotos, (ROHWER et al., 2001; BOURNE; MUNN, 2005) de onde se passou a inferir a íntima relação entre os corais escleractíneos e as bactérias a eles associados (KNOWLTON; ROHWER, 2003).

Segundo Lima (2002), os recifes de corais são construções biogênicas de significativo valor geológico; podendo estas estruturas ser classificadas pela natureza dos organismos responsáveis por sua construção ou pelas morfologias modeladas por fatores abióticos (WRIGTH; BURCHETTE, 1996). Tais construções biogênicas desempenham papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos marinhos, além de possuírem considerável importância ecológica dada à riqueza de espécies marinhas associadas constituindo um dos ecossistemas de mais elevada biodiversidade da biota; por conta desta complexa associação de diversas formas de vida, os recifes fornecem importantes dados sobre as condições abióticas como taxa de incidência solar (inferida à partir das taxas fotossintéticas dos organismos fotoautotróficos associados) e temperatura (inferida pela ocorrência ou não de espécies coralíneas estenotérmicas) sendo os corais, portanto, formidáveis bioindicadores de variações nas condições físico-químicas oceânicas.

Dentre as espécies de corais escleractíneos formadores de recifes, as pertencentes ao gênero *Siderastrea* destacam-se por sua distribuição ao longo do Sudoeste do Oceano Atlântico conforme trabalho inicial do zoólogo suíço Louis Agassiz e do

geólogo canadense Charles Hartt na segunda metade do século XIX (FREITAS, 2001), ampliado mais recentemente com a descrição da distribuição simpátrica de duas espécies do gênero *Siderastrea* ao longo da costa Nordeste Brasileira: *S. radians* e *S. stellata* (NEVES et al., 2008). No Brasil, a distribuição coralínea costeira é registrada desde o estado do Maranhão (cerca de 0°53' S, 44°16' W) até os recifes de Viçosa, na área de Abrolhos (18°01' S, 39°17' W), destacando-se as ilhas oceânicas de Fernando de Noronha e o Atol das Rocas (MMA, 2006).

Dentre os representantes do gênero *Siderastrea*, a espécie *Siderastrea stellata* é a que possui maior amplitude de ocorrência no litoral Brasileiro, com distribuição concentrada nas faixas de profundidade de até 10 metros, estendendo-se do estado do Maranhão até o Rio de Janeiro (CASTRO; PIRES 2001). Descrita inicialmente em 1968, a espécie *S. stellata* se caracteriza por uma considerável resistência à abrasão mecânica das ondas e demais tipos de perturbação do ambiente como variações na turbidez da água em seu entorno, salinidade e temperatura (LABOREL, 1970), como características taxonômicas, a espécie *S. stellata* apresenta colônias com pigmentação amarronzada (Health Coral Chart D5 e D6) e diâmetro médio de 10 centímetros com formato geralmente arredondado, aumento em diâmetro de acordo com a profundidade onde ocorre (podendo apresentar diâmetros superiores à 20 centímetros) e passando a apresentar uma morfologia mais achatada à alongada (COSTA, 2006).

1.2 Microrganismos Associados aos Corais Escleractíneos

A íntima associação das linhagens bacterianas aos seus hospedeiros escleractíneos resulta numa cooperação onde os procariotos são favorecidos pela guarida e disponibilidade de nutrientes e o coral resguardado de possíveis patógenos pela competição inter-específica dos microrganismos presentes (ROHWER & KELLEY, 2004). Um desequilíbrio na microbiota por fatores estressantes como aumento na temperatura (alteração climática), poluição, sobrepesca e alteração na dinâmica ecológica dos organismos associados direta ou indiretamente aos corais (HARVELL et al., 2002; SZMANT, 2002; JACKSON et al., 2001) pode provocar a baixa no *fitness* de um ou mais componentes da microbiota normal possibilitando assim a colonização de microrganismos potencialmente patogênicos como as espécies do gênero *Vibrio*, principalmente, *V. shiloi* e *V. harvey* já descritas como patógenos de corais e relacionadas a corais que sofriam processos de alteração na pigmentação

(KUSHMARO et al., 1996; 1997). Ao serem submetidos a uma nova condição ambiental, os corais passam a sofrer com o fenômeno de sucessão ecológica por conta da diminuição do *fitness* de sua microbiota associada com a concomitante elevação da capacidade de competição por sítios de adesão e da virulência de alguns patógenos; tal processo leva a uma inserção de outros microrganismos na microbiota do coral acarretando modificação da diversidade e desestabilizando o equilíbrio mutualístico entre os procariotos e o hospedeiro que, por sua vez, torna-se ainda mais susceptível por conta da agressão dos patógenos agora presentes e pelo desenvolvimento da virulência em linhagens outrora não-patogênicas, fatores estressores estes que culminam por favorecer ainda mais a sucessão dos microrganismos originais levando a um círculo vicioso capaz de comprometer de forma crônica a homeostase coralínea acarretando em um déficit qualitativo na associação mutualística entre o coral e o componente fotobionte da associação que, frequentemente, são algas do gênero *Symbiodinium* (referidas comumente como zooxantelas) (ROSENBERG et al., 2007) fato causador da alteração da pigmentação responsável pela síndrome de branqueamento (*bleaching*) do coral.

Uma análise preliminar das bactérias cultiváveis presentes nos tecidos dos corais demonstra notável diferença tanto na riqueza como na abundância quando comparado à coluna d'água na região do entorno coralíneo, tal constatação evidencia que a relação entre microrganismos e o coral hospedeiro vai além das conveniências locais, mas reflete uma associação intrincada ao longo do tempo. De fato, estudos recentes demonstram que populações bacterianas específicas estão relacionadas a corais específicos, sugerindo uma relação de coevolução entre as espécies (ROSENBERG, 2007).

Dentre as variadas interações ecológicas presentes nos recifes coralíneos, as associações com os microrganismos desempenham preponderante papel nos processos de prevenção de infecções que se dá, geralmente, pela ocupação destes nas áreas de superfície do coral, pela competição de nutrientes e na secreção de moléculas com atividade bactericida, enzimática dentre outras (ROHWER; KELLEY, 2004) acarretando o insucesso da colonização de outros microrganismos com menor capacidade de competição potencialmente virulentos para o coral. Similar à barreira imposta pela microbiota comensal que coloniza o tegumento, mucosa e demais estruturas nos seres humanos, protegendo-os – *lato sensu* – pela competição aos sítios de aderência e nutrientes com os microrganismos “exógenos”, as bactérias associadas

aos corais desempenham importante função na manutenção da homeostase destes organismos, protegendo-os da patogenicidade de demais microrganismos.

É sabido que uma ínfima parcela dos microrganismos pode ser isolada e cultivada pelos métodos tradicionais, e mesmo para estes, não é possível acessar a filogenia das espécies unicamente a partir de seu isolamento. Contudo, a utilização de bibliotecas genômicas construídas para o gene do rRNA 16S, depositadas em grandes bancos de dados mundiais e disponíveis para o livre acesso de diversos pesquisadores, torna possível não somente o levantamento completo da diversidade bacteriana bem como estabelece de maneira objetiva as relações evolutivas entre os organismos amostrados; por tal motivo, o uso de ferramentas moleculares e de bioinformática para a classificação de microrganismos bem como a descoberta de novas espécies a partir do sequenciamento genômico tem permitido uma mais ampla compreensão dos mecanismos evolutivos por trás das relações ecológicas encontradas na natureza.

1.3 Enzimas Extracelulares Bacterianas

As enzimas são catalisadores biológicos capazes de acelerar a velocidade das reações químicas tornando-as viáveis para a manutenção da homeostasia dos sistemas biológicos que, quando em condições não catalisadas, demorariam tanto para acontecer que tornariam termodinamicamente inviável toda a estruturação de organismos complexos. Além de formarem a base dos sistemas metabólicos, as enzimas proporcionam enormes oportunidades às indústrias por efetuarem conversões biocatalíticas com altíssimo rendimento e confiabilidade (GODFREY; WEST, 1996).

As enzimas hidrolíticas são largamente utilizadas em diferentes processos nas principais indústrias como a farmacêutica, têxteis, de detergentes, alimentícia e de biocombustíveis empregando diferentes classes de enzimas como as proteases, pectinases, lipases, celulasas, e etc. Num campo tão requisitado por novas moléculas bioativas, os microrganismos isolados de novos ambientes despontam como potenciais fontes para novas moléculas de emprego na indústria por conta da versatilidade metabólica e estabilidade em condições ambientais extremas (de temperatura, salinidade e etc.) em que estes organismos habitam.

1.3.1 Proteases

As proteases são importantes catalisadores biológicos, estando envolvidas com a hidrólise das proteínas por meio da quebra de ligações peptídicas na extremidade da cadeia polipeptídica (no caso de exopeptidases) ou no interior da cadeia (endopeptidases) e a liberação dos resíduos de aminoácidos, por tal propriedade o emprego destas enzimas é crescente nos processos industriais principalmente correlatos à produção de laticínios por sua ação da degradação de proteínas como a caseína, mas também na indústria farmacêutica e têxtil (HAKI; RAKSHIT, 2003), perfazendo – esta classe de enzimas – cerca de 60% do mercado global de catalisadores biológicos (RAO et al., 1998).

1.3.2 Celulases

As celulases (ou β -amilases) são capazes de hidrolisar as ligações do tipo O-glicosídicas entre resíduos de glicose dispostos em configuração isomérica do tipo Beta como ocorre no polissacarídeo mais abundante na biosfera que é a celulose, este glucano, embora abundante, pode ser degradado apenas por ínfima parcela de organismos que são capazes de realizar sua catálise em moléculas de glicose que poderiam, então, ser utilizadas em diferentes processos como para a produção de etanol. Além deste potencial emprego na indústria de biocombustíveis, as celulases são atualmente amplamente utilizadas nas indústrias de papel, têxtil e de detergentes (TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007).

1.3.3 Amilases

Diferentemente da celulose, o amido é um polissacarídeo formado por ligação entre resíduos de D-Glicose em configuração $\alpha 1 \rightarrow 4$, sendo o principal material de reserva nos vegetais e existindo na forma ramificada (ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$) denominada de amilopectina e na forma linear com estrutura em forma de α -hélice denominada amilose (BERG; TYMOCZO; STRYER, 2004). As amilases são as enzimas capazes de

hidrolisar o amido em diferentes pontos de sua estrutura linear ou ramificada sendo utilizadas em processos da indústria açucareira a partir da liquefação (por conta da quebra de extremidades não redutoras) do amido. (SOLIMAN, 2008).

1.3.4 Lipases

As hidrolases que atuam sobre as ligações éster atribui-se o termo genérico de lipases que agem na interface óleo-água desfazendo as ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis liberando cadeias de ácidos graxos livres e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998). As lipases possuem alta aplicação industrial alimentícia, oleoquímica, cosméticos e detergentes além de participarem no processo de elaboração de polímeros sintéticos (SHARMA et al., 2011).

1.4 Moléculas Microbianas com Atividade Bactericida

Dentre os principais gêneros de microrganismos presentes do ambiente marinho, o gênero *Bacillus* destaca-se por sua distribuição ubíqua e por ser uma riquíssima fonte de moléculas bioativas. As bactérias do gênero *Bacillus* são pertencentes à família Bacillaceae e compõe-se de um enorme grupo de bactérias heterogenicamente diversificada. As células pertencentes a esse gênero apresentam-se com morfologia de bastonete cuja suas extremidades são retas ou arredondadas com o tamanho médio que varia entre 0,5 x 1,2 µm à 2,5 x 10 µm de espessura (RIBEIRO, 2011). A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos e patógenos humanos têm sido bastante pesquisada recentemente, haja vista que várias espécies desse gênero são responsáveis pela produção não só de bacteriocinas, mas também de peptídios antifúngicos e antibacterianos (SCHULZ et al., 2005); o sequenciamento de regiões gênicas largamente distribuídas neste gênero de bactérias tem revelado que cerca de 8% dos genes são destinados à produção de antibióticos (MONDOL et al., 2013).

Entre as moléculas promissoras, pode-se citar a Entomocina IX que vem se mostrando biologicamente ativa contra patógenos significativos como *Pseudomonas aeruginosa* e vários fungos. Essa bacteriocina manteve 72% de sua atividade antimicrobiana quando incubada a 121°C. Sendo estável na faixa de pH de 3 a 9, e só perdendo sua atividade quando tratada com proteinase K, com baixa toxicidade às linhagens de células Vero (CHERIF et al., 2003).

A evolução e a propagação de patógenos bacterianos resistentes à antibióticos é uma crescente ameaça à saúde pública global. As taxas de resistência em bactérias são crescentes em todo o mundo resultando em mortes por patógenos outrora controláveis por meio de terapia antibiótica. A esperança para a resolução desta crise (cada vez mais assemelhável à era anterior ao uso clínico de medicamentos antibióticos) reside na prospecção de novas fontes de moléculas bioativas com diferenciadas estruturas químicas. Assim sendo, a prospecção de organismos com considerável atividade antagonista frente à patógenos de interesse constitui uma estratégia de melhor custo-benefício quando comparado com a engenharia química de variadas moléculas sintéticas de potencial atividade bactericida que podem, ao cabo, mostrarem-se inócuas à patógenos multirresistentes pois, como estas moléculas sintéticas tem suas estruturas “inspiradas” em modelos pré-existentes, correm o alto risco de serem neutralizadas por mecanismos de resistência já desenvolvidos nos organismos alvo, como ocorre à miúdo no processo de desenvolvimento de novos antibióticos β -lactâmicos (ANDERSSON et al., 2001; WILKE et al., 2005).

1.5 Caracterização dos Microrganismos

As bactérias, termo genericamente utilizado para descrever os organismos pertencentes ao domínio Bactéria e Eubactéria, são procariotos unicelulares surgidos aproximadamente a 3,5 bilhões de anos atrás no planeta. Apesar de constituírem dois dos três Domínios da Vida existente na Biosfera, com uma ordem de grandeza de 10^{30} (JANSSON; PROSSER, 2013) bactérias perfazendo o correspondente a 4.1 petagramas (Pg) de C e aproximadamente 0.6% da biomassa total da Terra (KALLMEYER et al., 2012), pouco se conhece de sua filogenia e diversidade que se reflete nas abundantes estratégias de vida que vão dos organismos anaeróbios quimiolitotróficos ou fotoautotróficos até as formas aeróbias heterotróficas.

Os métodos utilizados para a descrição e classificação dos microrganismos baseiam-se, classicamente, nas características fenotípicas destes organismos como sua morfologia resposta aos corantes específicos bem como capacidade de oxidação de determinados compostos. Quanto à morfologia, os microrganismos podem ser estudados quanto à sua forma – seja em bastonetes, cocos ou formas espiraladas – e arranjo que é o modo como as formas bacterianas se agrupam que variam desde a ausência de arranjo até formas complexas.

Ainda, a resposta que cada bactéria apresenta a coloração de Gram é amplamente utilizada na classificação, separando os microrganismos capazes de reter a coloração (bactérias Gram positivas) daquelas incapazes de fazê-lo (bactérias Gram negativas); sendo possível inferir a partir desta reação a macroestrutura do envoltório celular destes organismos que geralmente apresentam parede espessa de peptidoglicanos na parede celular dos representantes Gram positivos e uma delgada camada de peptidoglicano com uma membrana externa adicional nos representantes Gram negativos.

As condições de crescimento também são classicamente utilizadas para a caracterização de linhagens de procariotos, a capacidade de utilizar uma determinada fonte de carbono ou a propriedade intrínseca de reagir com peróxido de hidrogênio ou possuir a enzima citocromo oxidase permite separar organismos indistinguíveis do ponto de vista morfológico e em relação à coloração de Gram por aspectos fisiológicos como a aerobiose ou anaerobiose facultativa.

Contudo, tais características fenotípicas muitas vezes são incapazes de fornecer uma classificação inequívoca por limitações naturais do próprio método: uma determinada bactéria que naturalmente não oxida um dado substrato pode, por exemplo, passar a fazê-lo caso possua um plasmídeo que carregue a informação para a síntese de uma enzima capaz de metabolizar o dado substrato utilizado para o teste fenotípico, gerando, assim, imprecisões unicamente corrigidas com o refinamento molecular no processo de caracterização. Nos últimos anos, as técnicas moleculares adquiriram importância fulcral no processo de identificação de microrganismos por eliminar as potenciais ambiguidades dos métodos fenotípicos, bem como por ampliar a quantidade de amostras que podem ser analisadas num menor espaço de tempo; com o estabelecimento da reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) tornou-se exequível o estabelecimento de filogenias dos grandes grupos de microrganismos baseadas em cronômetros moleculares como, por exemplo, o gene do rRNA 16S para os procariotos e o rRNA 18S para os eucariotos.

Com base no estudo das sequências do gene de rRNA 16S, 12 filos do domínio Bacteria foram determinados inicialmente (WOESE, 1987), estando as bactérias classificadas, atualmente, em 52 filos incluindo representantes unicamente conhecidos por sua sequência de nucleotídeos, por serem impossíveis de se cultivar e classificar pelos métodos tradicionais (RAPPE & GIOVANNONI, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

1. Caracterização da atividade enzimática e antibacteriana das bactérias associadas aos corais escleractíneos da espécie *Siderastrea stellata* da região costeira do Estado da Paraíba.

2.2 Objetivos Específicos

1. Detecção de linhagens bacterianas produtoras de celulases e proteases extracelulares;
2. Determinar o pH ótimo para o crescimento das bactérias celulolíticas;
3. Analisar gradualmente a produção de celulases para as linhagens celulolíticas mais relevantes;
4. Avaliar o perfil proteico das linhagens celulolíticas;
5. Bioprospecção de linhagens antagonistas frente a bactéria *Vibrio harvey*, causadora de doenças em corais.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e Caracterização das Linhagens Bacterianas

As cepas bacterianas estudadas foram isoladas de tecidos do coral escleractíneo *Siderastrea stellata* sadio (figura 3) e com sinais de alteração de pigmentação (colônias roxas) (figura 4) nos recifes de Cabo Branco (Figura 1), (7°08'50"S; 34°47'51"W), situados na proximidade da falésia da Ponta do Seixas no município de João Pessoa, Paraíba, Brasil (Figura 2) em Maio de 2010; com ajuda de martelo e cinzel, pequenas amostras dos corais coletados foram transportados em sacolas plásticas contendo água do mar filtrada da região do estudo para o laboratório onde foram então processadas, os tecidos foram removidos, em meio estéril, através da utilização de jatos de compressão a ar, segundo descrito por Dustan (1979). A caracterização das bactérias, realizada em trabalhos anteriores a este por Medeiros (2012), se deu em base à sua morfologia, coloração de Gram e capacidade de formar, ou não, endósporos e prova da catalase e seguiram, para a coloração de Gram, a metodologia proposta por Huecker modificada (SMIBERT; KRIEG, 1994) e o método descrito por Gerhardt et al. (1994) modificado para detecção de endósporos. As amostras de tecidos extraídos de ambas as amostras de coral (sadio e com pigmentação alterada) foram homogeneizadas, separadamente, e diluídas serialmente em água do mar filtrada e estéril proveniente da região do estudo e inoculadas em meio de cultivo Ágar marinho (pH 7,6) constituído de 5g de peptona (Difco), 2,5 g de extrato de levedura (Difco), 15 g de agar, 1000 mL de água do mar filtrada coletada no local do estudo. As culturas em placas de Petri foram incubadas a 30° por 5 dias. As colônias bacterianas obtidas foram então isoladas e plaqueadas em novos meios de cultivo estéreis até a confirmação do isolamento e, posteriormente, depositadas num banco de linhagens provenientes de cada uma das amostras de coral amostrado. As linhagens bacterianas obtidas a partir do coral com aspecto macroscópico sadio foram catalogadas com o código "SS" e as linhagens bacterianas obtidas a partir do coral com aspecto macroscópico apresentando sinais de despigmentação, catalogadas com o código "SR". Ao total, foram estudadas 29 cepas do coral sadio (linhagem SS_) e 40 cepas do coral roxo (linhagem SR_).

Tabela 1. Biótipos das linhagens bacterianas isoladas do coral *Siderastrea stellata* sadio.

COLORAÇÃO DE GRAM	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	PRODUÇÃO DE CATALASE	BIÓTIPOS	LINHAGENS
G+	Bastonetes, sem Endósporos	Catalase +	A	SS02, SS12, SS13, SS14, SS16, SS19, SS20, SS25, SS30, SS35, SS36
G+	Bastonetes, sem Endósporos	Catalase -	B	SS03, SS04, SS08, SS09b, SS10, SS11, SS15, SS21a, SS21b, SS24, SS27, SS29, SS33, SS37
G+	Bastonetes, com endósporos	Catalase +	C	SS18
G+	Cocos	Catalase +	E	SS09a, SS22, SS28

Tabela 2. Biótipos das linhagens bacterianas isoladas do coral *Siderastrea stellata* com pigmentação alterada (roxa).

COLORAÇÃO DE GRAM	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	PRODUÇÃO DE CATALASE	BIÓTIPOS	LINHAGENS
G+	Bastonetes, sem Endósporos	Catalase +	A	SR01, SR09, SR13, SR17, SR19, SR21, SR24, SR27, SR30, SR34, SR51, SR54, SR62
G+	Bastonetes, sem Endósporos	Catalase -	B	SR08, SR15, SR25, SR39, SR50, SR55
G+	Bastonetes, com Endósporos	Catalase +	C	SR02m, SRO3, SR05, SR11, SR22, SR29, SR41, SR60, SR61

G+	Bastonetes, com endósporos	Catalase -	D	SR04
G+	Cocos	Catalase +	E	SR02B, SR26, SR45
G+	Cocos	Catalase -	F	SR38
G+	Filamentosos	Catalase -	G	SR14, SR31
G-	Bastonetes	Catalase +	H	SR18, SR20, SR35, SR37
G-	Bastonetes	Catalase -	I	SR07

Todos os testes foram realizados nas dependências do Laboratório de Biologia de Microrganismos do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.



Figura 1. Recifes costeiros da Ponta do Seixas, João Pessoa–PB. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.



Figura 2. Falésia da Ponta do Seixas, João Pessoa –PB. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.



Figura 3. Aspecto macroscópico do coral *Siderastrea stellata* sadio. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.



Figura 4. Aspecto macroscópico do coral *Siderastrea stellata* com sinais de mudança na pigmentação natural. Fonte: Daianne Medeiros, 2012.

3.2 Detecção da Atividade Enzimática Extracelular em Meio Sólido

Para os experimentos de detecção de atividade enzimática extracelular em meio sólido, as linhagens isoladas foram cultivadas em meio Agar Marinho (constituído de água do mar filtrada, 0,5% de Peptona (Difco), 0,1% de Extrato de Levedura (Difco) e 1,5% de Agar) por 48 h a 37 °C e então semeadas para os meios contendo o polímero-alvo (gelatina, celulose, amido e óleo vegetal) de degradação por 96 horas à 37 °C. A produção de celulases e proteases foi avaliada em todas as linhagens (69) e, aquelas que apresentaram atividade celulolítica, também foram testadas em relação à produção de lipases e amilases.

3.2.1 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi detectada seguindo a metodologia descrita por Smibert; Krieg (1994), com modificações, onde as linhagens são inoculadas em meio constituído de 20 g de Gelatina; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,16 g de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ e 15 g de Ágar (Difco) para 1000 mL (pH 7,0). Para melhor emular as condições ambientais nativas, utilizou-se água do mar filtrada estéril como solvente do meio. A atividade é observada pela formação de halos de degradação do substrato presente em cultura após a adição do reativo de Frazier (12 g de $HgCl_2$; 16 mL de HCl concentrado para 80 mL de água destilada).

3.2.2 Atividade Celulolítica

Este teste foi realizado de acordo com Theather; Wood (1982), as linhagens foram semeadas em meio contendo 1 g de Carboximetilcelulose (CMC); 0,5 g de $NaNO_3$; 1 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 g de Extrato de Levedura (Difco) e 15 g de Ágar para 1000 mL de água do mar filtrada, pH 7. Após o período de incubação (96 horas a 37 °C) o meio de cultura foi corado com uma solução de vermelho congo (1 mg/ml) por 30 minutos e descorado com a adição de NaCl 1 M por igual período de tempo. A formação de halos amarelados ao redor das colônias indica degradação da celulose.

3.2.3 Atividade Amilolítica

A detecção de amilases em meio sólido se deu de acordo com Smibert; Krieg (1994) semeando as linhagens, selecionadas após os testes de atividade celulolítica e proteolítica, em meio contendo 2 g de Amido; 0,5 g de NaNO_3 ; 1 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g de Extrato de Levedura (Difco) e 15 g de Ágar para 1000 mL de água do mar filtrada, pH 7. A formação de halos de degradação foi revelado com a adição de uma solução contendo 0,66 g de I_2 ; 1,22 g de KI para 1000 mL de água destilada.

3.2.4 Atividade Lipolítica

O teste seguiu a metodologia proposta por Kouger; Jaeger, (1987). As linhagens foram incubadas em meio contendo 8 g de Caldo Nutriente (NB); 4 g de NaCl; 3% (v/v) de Óleo Vegetal e 0,001% (m/v) do corante Rodamina B. As linhagens foram incubadas por 96 h a 37 °C e posteriormente analisadas sob incidência de radiação ultravioleta a 350 nm (SHELLEY et al., 1987), o aparecimento de colônias com um halo alaranjado ao seu redor indica atividade lipolítica.

3.3 Avaliação do Crescimento Bacteriano

O Crescimento das linhagens selecionadas nos experimentos de atividade enzimática extracelular celulolítica em meio sólido bem como as linhagens escolhidas para os experimentos de cultivo em meio líquido foram acompanhadas por meio de espectrofotometria à 600 nm (utilizando-se cubetas de vidro) para a determinação da faixa ótima de pH para crescimento (selecionados os valores 4,6,7,8 e 10) . Durante os experimentos de cultivo em meio líquido (meio CMC sem ágar de acordo com o item 3.2.2) a absorbância diária das culturas foi medida durante quatro dias para um acompanhamento detalhado do crescimento das linhagens estudadas.

3.4 Avaliação da Produção de Celulases em Meio Líquido

A análise quantitativa da atividade celulolítica foi determinada para as linhagens que apresentaram alta produção de celulases no meio sólido. As linhagens SR05, SR31 e

SR41, selecionadas com base na intensidade da atividade celulolítica, condições de crescimento e diversidade de biótipo, foram cultivadas em Ágar Marinho sólido (constituído de água do mar filtrada, 0,5% de Peptona (Difco), 0,1% de Extrato de Levedura (Difco) e 1,5% de Agar) e após incubação por 48 h a 37 °C, transferida uma alçada de uma colônia para 10 mL de Caldo Marinho estéril e levado à incubação, sob agitação constante de 150 rpm, por 48 h a 37 °C, posteriormente, uma alíquota de 0,5 mL foi inoculado em 50 mL de meio líquido contendo CMC (conforme descrito no item 3.2.2) e incubado, sob agitação constante à 150 rpm, por 120 h à 40 °C.

3.4.2 Dosagem de Açúcares Redutores Totais

Os açúcares redutores totais dos experimentos de cultivo de bactérias em meio líquido foram quantificados, a cada 24 h, pelo método descrito por Miller (1959) com o uso do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Alíquotas de 1 mL do cultivo em meio líquido foram centrifugadas a 8 000 rpm, 4 °C, por 15 minutos e 0,5 mL do sobrenadante incubado com 1,5 mL do reagente contendo DNS por 10 minutos à 100 °C, posteriormente o resultado foi observado em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000) a 520 nm e comparado com uma curva padrão previamente construída com concentrações determinadas de D-Glicose nas mesmas condições experimentais descritas. Os experimentos de espectrofotometria foram realizados em cubetas de quartzo e em triplicatas.

3.4.3 Quantificação de Proteínas Solúveis Totais

Para a quantificação de proteínas solúveis durante os experimentos de cultivo em meio líquido, a cada 24 h, utilizou-se a metodologia proposta por Bradford (1976). Alíquotas de 0,5 mL, obtidas a partir do sobrenadante da centrifugação a 8 000 rpm, 4 °C, por 15 minutos de 1 mL do cultivo em meio líquido, foram diluídas em 1,5 mL do Reagente de Bradford e suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com uma curva padrão previamente construída com concentrações determinadas de Albumina Bovina Sérica (BSA). Os experimentos de foram realizados em cubetas de quartzo e em triplicatas.

3.4.4 Avaliação do pH ótimo para a atividade celulolítica

Com o intuito de observar a taxa de degradação do substrato celulose pelas celulasas extracelulares secretadas, pH ótimo de catálise, e termoestabilidade, realizou-se um experimento de atividade enzimática, com as três linhagens celulolíticas selecionadas, onde três tampões à base de Acetato de Sódio (200 mM) foram preparados nos pHs 5, 7 e 9 contendo 4% (m/v) de Carboximetilcelulose. Os tampões foram esterilizados e procedeu-se a reação enzimática com a adição de 0,7 mL de cada um dos tampões com 0,7 mL do sobrenadante resultante da centrifugação de 1 mL do cultivo em meio líquido (por 120 h em meio de indução de celulasas sob agitação de 150 rpm a 40°C) de cada linhagem estudada, deixando-se reagir por 10 minutos a 50 °C. Posteriormente, 0,5 mL do sistema reacional foi incubado com 1,5 mL do Reagente contendo DNS para a determinação dos açúcares redutores totais, segundo método descrito por Miller (1959).

3.5 Atividade Antagonista das Bactérias Isoladas do Coral de *S. stellata* com Pigmentação Alterada.

Dentre os principais patógenos de corais, destacam-se os microrganismos pertencentes ao gênero *Vibrio*. As espécies *V. shiloi* e *V. harvey* são amplamente descritas na literatura por associação com corais em processo de alteração de pigmentação e com desenvolvimento de necrose tissular (LUNA et al., 2007; LUNA et al, 2010). Procurou-se, então, com os experimentos de antagonismo identificar algum isolado que se mostrasse antagônico frente a *V. Harvey* e avaliar a capacidade de proteção aos corais hospedeiros, visando uma futura prospecção de moléculas extracelulares com atividade bactericida. A cepa *V. harvey* juntamente com as linhagens analisadas foram inicialmente cultivadas durante dois dias a 35 °C no meio TCBS (NAKANISHI, 1963) com modificações (1% de Peptona (Difco), 0,5% de Extrato de Levedura (Difco) 1% de Citrato de Sódio, 1% de Tiosulfato de Sódio, 2% de Sacarose, 1% de Cloreto de Sódio, 0,1% de Citrato de Ferro III e 1,5% de Agar, pH=7,6) e posteriormente transferidas para meio TCBS, modificado, líquido onde cresceram, sob agitação de 150 rpm à 35°C, *overnight*. A partir destas culturas em meio líquido foi montado o experimento de antagonismo em placa seguindo metodologia proposta por Burkholder (1966) com modificações, onde 0,5 mL de meio líquido contendo a espécie *V. harvey* incubada *overnight* foi espalhado com o auxílio de um *swab* estéril de modo a

formar um camada homogênea de microrganismo numa placa de Petri contendo meio TCBS sólido estéril, após isto 10 µl das demais linhagens cultivadas em meio líquido foram pipetadas (quatro pontos distintos em forma de cruz) na placa previamente semeada com *V. harvey* e incubadas a 37 °C por 48 h visando o crescimento de colônias isoladas das linhagens em contato com a cepa-alvo de *Vibrio*, caso as linhagens secretem alguma substância antibacteriana o crescimento da *V. harvey* será comprometido formando um halo tornado possível a detecção do antagonismo entre as duas linhagens de microrganismos.

3.6 Análise do Perfil Proteico das Linhagens Celulolíticas

As três linhagens selecionadas para a fase de experimentos de cultivo em meio líquido também tiveram seus perfis proteicos analisados. As linhagens foram incubadas em Caldo Marinho e em meio de indução de celulases (contendo 1 g de Carboximetilcelulose (CMC); 0,5 g de NaNO₃; 1 g de K₂HPO₄; 0,5 g de MgSO₄·7H₂O; 0,01 g de FeSO₄·7H₂O; 1 g de Extrato de Levedura (Difco) para 1000 mL de água do mar filtrada), ambos os meios contendo pH 7,2, durante 48h a 40 °C sob agitação de 150 rpm. Após incubação o cultivo foi centrifugado a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C e os pellets obtidos lisados com adição de tampão Acetato de Sódio pH 7,2 contendo lisozima e utilizando ultrasonicador (Bandelin®) em 6 ciclos de 12 segundos com potência máxima de 40%. O extrato resultante foi centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 10 000 rpm, os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20 °C. O sobrenadante dos cultivos também foi congelado para a confirmação, em eletroforese, de enzimas extracelulares à partir de suas respectivas bandas eletroforéticas. O extrato proteico celular bem como os sobrenadantes dos cultivos foram concentrados com acetona (na proporção de 1:2 v/v) durante duas horas e então centrifugados por 15 minutos a 15 000 rpm a 4 °C sendo o sobrenadante descartado e o pellet resuspenso em 20 µL de tampão contendo glicerol e azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada segundo metodologia proposta por Laemmli (1970) em gel de poliacrilamida a 12,5% com uma corrente de 150 Volts. Após a eletroforese o gel foi corado com Azul de Comassie 1%, descorado (solução aquosa a base de 40% (v/v) de Metanol e 5% (v/v) de Ácido Acético), digitalizado e fotografado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfofisiológica das Linhagens Isoladas

Neste estudo foram analisadas as 29 linhagens isoladas do coral sadio de *S. stellata* e 40 linhagens obtidas da amostra de coral com pigmentação roxa. As bactérias apresentaram no total nove biótipos (tabelas 1 e 2).

Além da predominância da forma de bastonete, os microrganismos Gram positivos constituíram o grupo mais representativo entre as linhagens bacterianas isoladas das duas amostras de coral, a porcentagem de bactérias Gram negativas totais correspondeu a apenas 7,2% enquanto as bactérias Gram positivas corresponderam a 92,8% do total das linhagens isoladas. Todos os isolados do coral sadio (SS) foram Gram positivos agrupados em quatro biótipos, enquanto os isolados do coral com pigmentação rosa (SR) apresentaram nove biótipos, sendo sete destes constituídos de bactérias Gram positivas e dois de linhagens Gram negativas (tabelas 1 e 2).

Tal preponderância de microrganismos Gram positivos encontrados neste trabalho reflete a inquestionável relevância no papel ecológico em todo o ecossistema marinho destes organismos (GONTANG et al., 2007) ao passo que indica o tamanho desconhecimento da real dimensão da riqueza e distribuição das espécies bacterianas Gram positivas nas regiões oceânicas (MALDONADO, 2005).

4.2 Atividade Enzimática Extracelular em Meio Sólido

Das 69 linhagens estudadas, três linhagens do coral sadio e sete do coral roxo mostraram-se positivas para a atividade celulolítica (figura 5) (tabela 3); em relação à atividade proteolítica dez linhagens do coral sadio e doze do coral roxo demonstraram-se positivas (figura 6) (tabela 3). Das linhagens celulolíticas 60,0% consistiam de bastonetes Gram +, com endósporos (biótipo C) e 30,0% eram bastonetes Gram +, sem endósporos (biótipo A) e 10,0% bactérias filamentosas (biótipo G); 50,0% das linhagens com atividade proteolítica amostradas pertenciam ao biótipo A, sendo 29,1% do Biótipo B, 12,5% consistiam de Cocos Gram + (biótipo E), 4,16% de cocos Gram + (biótipo F) e 4,16% pertenciam ao biótipo G. Para fins de classificação, foi considerado como atividade significativamente positiva as linhagens que produziram halos de degradação

com diâmetros superiores a 1 cm, sendo considerada como alta atividade os halos com diâmetros aproximados a três centímetros ou superiores.

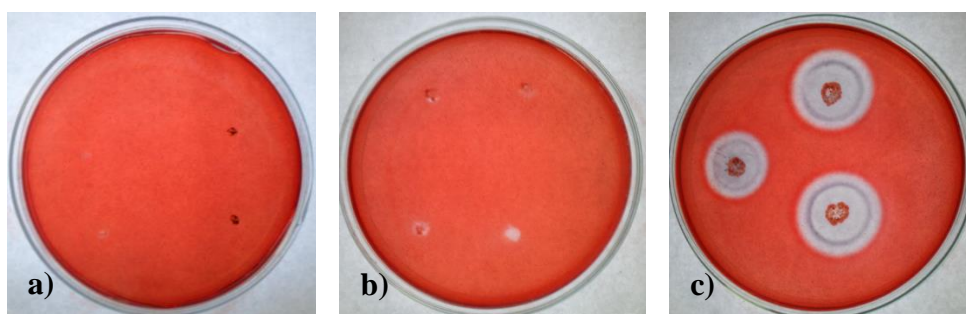


Figura 5. Aspectos do teste de atividade celulolítica: a) resultado negativo (não há a formação de halo); b) resultado positivo demonstrando degradação do substrato ao redor da colônia (embora não significativa para fins de prospecção; c) resultado positivo com halo bem evidente de diâmetro superior a 3 cm.

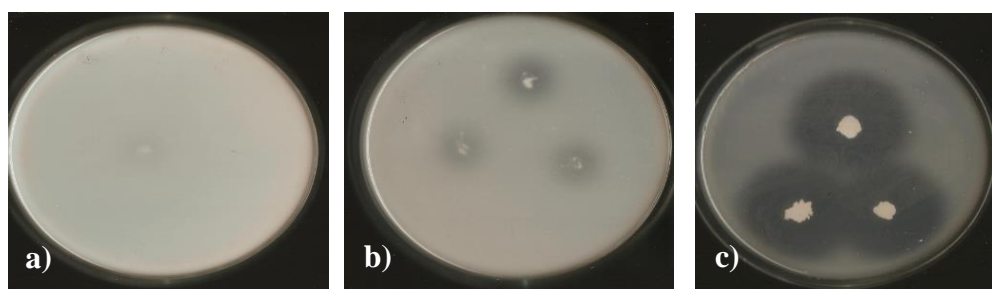


Figura 6. Aspectos do teste de atividade proteolítica: a) resultado negativo (sem formação de halo); b) resultado positivo demonstrando degradação tênue do substrato ao redor da colônia (halos médios de 1cm de diâmetro); c) resultado positivo com halos conspícuos de diâmetro superior a 3 cm de diâmetro.

Tabela 3. Atividade proteolítica e celulolítica de enzimas extracelulares secretadas por bactérias associadas ao coral *S. stellata*.

Linhagem	Atividade Celulolítica	Atividade Proteolítica
SS02	-	-
SS03	-	+
SS04	-	-
SS08	-	-
SS09a	-	++
SS09b	++	+
SS10	-	-
SS11	-	-
SS12	-	++

SS13	-	-
SS14	-	-
SS15	-	-
SS16	-	-
SS18	++	-
SS19	-	-
SS20	-	-
SS21a	-	-
SS21b	-	-
SS22	-	+
SS24	-	-
SS25	++	++
SS27	-	+
SS28	-	++
SS29	-	+
SS30	-	-
SS33	-	-
SS35	-	++
SS36	-	-
SR01	-	-
SR 02b	-	-
SR02m	-	+
SR03	-	-
SR04	-	-
SR05	++	++
SR07	-	-
SR08	-	-
SR09b	-	-
SR11	-	+
SR13	-	-
SR15	-	+
SR17	-	-
SR18	-	-
SR19	-	-
SR20	-	-
SR21	-	+
SR22	++	++
SR24	-	-
SR25	-	-
SR26	-	-
SR27	-	-
SR29	-	+
SR30	-	-
SR31	++	++
SR34	-	+
SR35	-	-

SR37	-	-
SR38	-	+
SR39	-	+
SR41	++	++
SR44	++	-
SR45	-	-
SR50	-	+
SR51	-	-
SR54	-	-
SR55	-	-
SR60	++	++
SR61	++	-
SR62	-	-

Legenda: Negativo (-), positivo com halo inferior a 3cm (+), positivo com halo superior a 3 cm (++)

Das enzimas estudadas, as proteases foram as mais ubiquamente encontradas com 31,88% das bactérias apresentando considerável atividade enquanto que, ao levar em consideração os diferentes níveis de atividade proteolítica, a porcentagem eleva-se para 64,32%. Em isolamento de linhagens de solo, Gorch-Lira e Coutinho (2007) encontraram uma maior quantidade de linhagens termofílicas secretoras de proteases, indicando que apesar das diferenças ambientais, as proteases constituem um grupo de enzimas de vasta distribuição na microbiota.

De todas as bactérias estudadas, 14,49% apresentaram considerável atividade celulolítica. As celulasas são altamente requisitadas para novos processos industriais e, apesar da pouca informação disponível na literatura científica sobre linhagens celulolíticas isoladas de corais escleractíneos, este dado aponta para uma nova e potencial fonte de isolamento de microrganismos com atividades enzimática de interesse, pois a região coralínea presente na costa é submetida a variações drásticas de temperatura e salinidade de acordo com o movimento das marés, estando em alguns períodos totalmente fora da água (figura 1 e 2), portanto organismos com atividade enzimática extracelular que suportem condições extremas e variáveis de temperatura e salinidade e de radiação (no caso em estudo, solar) devem possuir enzimas termostáveis (SOLIMAN, 2008) o suficiente para poderem desempenhar sua atividade catalítica, apesar das condições extremas do meio onde ocorre o microrganismo.

Dentre as linhagens produtoras de celulasas e proteases, 10 foram selecionadas (com base na taxa de crescimento, biótipo e alta atividade enzimática extracelular) para uma posterior etapa de prospecção por lipases e amilases com o objetivo de identificação de

linhagens altamente versáteis do ponto de vista molecular, apresentando diversas moléculas bioativas de interesse. Para a continuação dos ensaios foram escolhidas as linhagens SS18, SR22, SS09B, SS61, SR60, SS25, SR41, SR31, SR05 e SR44. Dentre estas dez linhagens, com exceção das linhagens SS18 e SR31, todas as demais apresentaram considerável atividade amilolítica (figura 7).



Figura 7. Atividade amilolítica de linhagens isoladas do coral *S. stellata*.

Quanto à detecção de lipases, quatro linhagens das previamente selecionadas mostraram-se produtoras: SS09b, SS25, SR44, SR61 (figura 8).

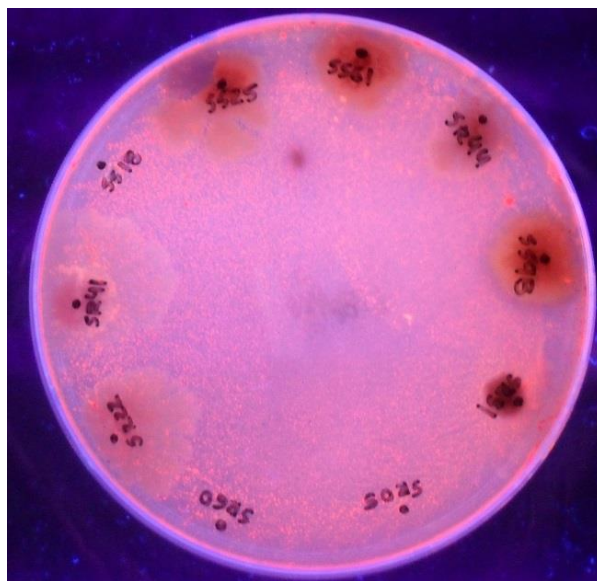


Figura 8. Atividade lipolítica de linhagens isoladas do coral *S. stellata*.

Assim, as linhagens SS09b, SS25, S44, SR61 mostraram-se altamente versáteis dentre todas as linhagens isoladas e amostradas neste trabalho, apresentando considerável atividade enzimática extracelular em meio sólido de lipases, celulases, amilases e proteases.

4.3 Atividade Antagonística de Bactérias

Dentre as linhagens SR estudadas, somente a SR09b (com halo superior a 3 cm quando incubada à 35°C por quatro dias) apresentou atividade antagonica considerável frente à linhagem de *V. harvey* enquanto outras linhagens tiveram seu próprio crescimento atenuado quando colocadas em contato com a cepa-alvo de *Vibrio*, indicando um antagonismo da linhagem de *Vibrio* sobre estas linhagens SR, ou não tiveram modificação no padrão de crescimento em meio a cepa-alvo de *Vibrio* quando comparadas ao seu crescimento controle (placas com o mesmo desenho experimental utilizado para os testes de antagonismo, estando ausente a cepa de *V. harvey*).

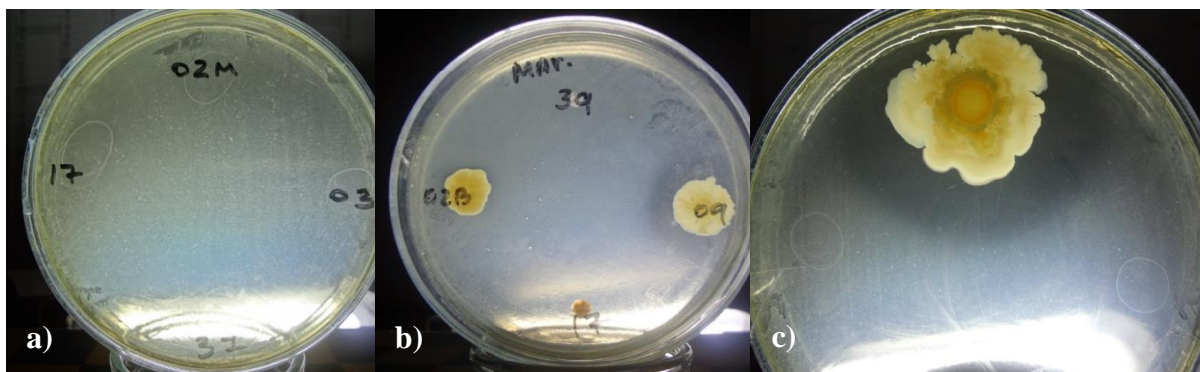


Figura 9. Aspectos do teste de antagonismo bacteriano: a) Resultado negativo (não há inibição da linhagem *V. harvey*); b) Resultado positivo (inibição do crescimento de *V. harvey* pela linhagem SR09); c) Detalhe do crescimento da linhagem SR09 e do halo de inibição do crescimento de *V. harvey* em seu entorno.

No teste de antagonismo bacteriano as linhagens testadas, quando submetidas ao contato com a linhagem-alvo de *V. harvey* apresentaram algumas modificações quanto ao crescimento de suas colônias: Algumas linhagens (como a SR17 e 39) tiveram crescimento reduzido quando em contato com a cepa-alvo de *Vibrio*, enquanto outras não modificaram seu padrão de crescimento (como a SR02b), contudo, sem apresentar atividade antagonica, já a linhagem SR09b não só cresceu significativamente bem como apresentou um halo ao seu redor evidenciando a atividade antagonica frente a *V. harvey*.

A baixa porcentagem de linhagens capazes de inibir o crescimento da linhagem patogênica aos corais escleractíneos *V. harvey* nas linhagens isoladas do coral com pigmentação roxa é um indicativo de baixa proteção do hospedeiro por bactérias associadas frente ao patógeno *V. harvey*. Araujo (2013) observou que das linhagens bacterianas isoladas do coral *S. stellata* com pigmentação roxa, 58% foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, enquanto que as bactérias desse gênero não foram observadas entre os isolados do coral sadio.

4.4 Avaliação do efeito do pH do Meio de Cultivo sob o Crescimento das Linhagens

As linhagens selecionadas após a prospecção por versatilidade de enzimas extracelulares e maior produção de celulases extracelulares (SS18, SR22, SS09b, SS61, SR60, 22S5, SR41, SR31, SR05 e SR44) foram avaliadas (gráfico 1) do ponto de vista do seu crescimento (cultivo em Caldo Marinho à 37 °C por 48 h sob agitação constante de 150 rpm) para a determinação de condições ótimas de cultivo em meio de detecção de celulases. Os experimentos de crescimento bacteriano indicaram uma melhor faixa de crescimento das linhagens estudadas na faixa do pH alcalino (pH 7 – 10), que reflete as condições ambientais onde estes organismos habitam, pois o pH dos oceanos encontra-se também na faixa alcalina (aproximadamente 8,5). Contudo, processos de modificação do pH do mar pelos processos de acidificação e o aumento da temperatura já foram relacionados com o aumento de doenças à espécies sensíveis a mudanças nos parâmetros físico-químicos, uma dos possíveis fatores desencadeadores do desenvolvimento de patologias é a ativação da virulências dos potenciais patógenos que pode ser temperatura-dependente (BEN-HAIM et al., 2003).

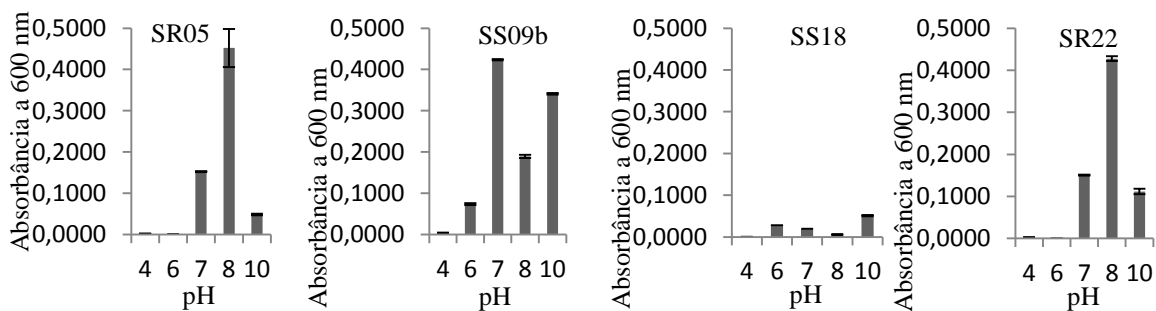


Gráfico 1. Avaliação do crescimento das linhagens SR05, SS09B, SS18, SR22 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs.

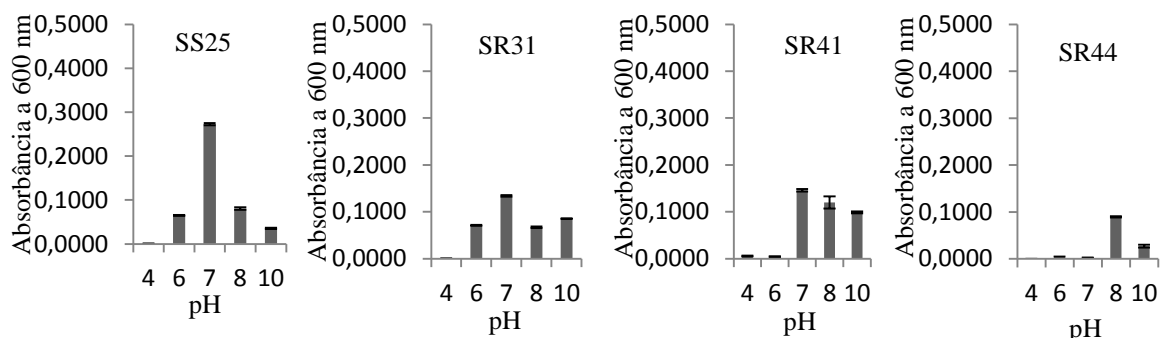


Gráfico 2. Avaliação do crescimento das linhagens SS25, SR31, SR41, SR44 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs.

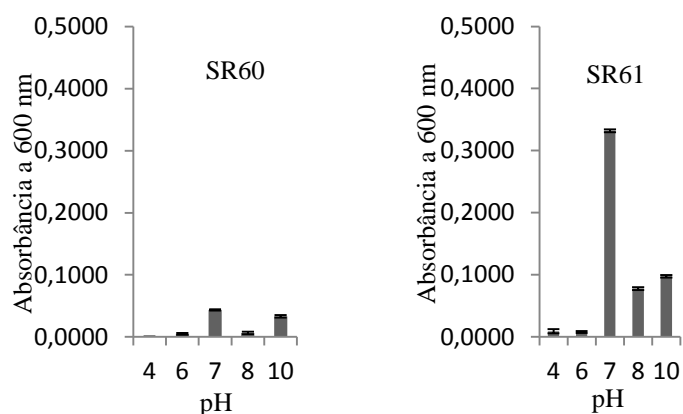


Gráfico 3. Avaliação do crescimento das linhagens SR60, SR61 por espectrofotometria a 600nm, após 48 horas de cultivo em meio CMC sob diferentes pHs.

Com base na intensidade da atividade celulolítica (tabela 3), condições de crescimento (gráfico 1) e diversidade de biótipo (tabelas 1 e 2), três linhagens foram escolhidas dentre as dez linhagens celulolíticas para o prosseguimento dos experimentos em incubação em meio líquido contendo CMC; para um maior detalhamento sobre o hábito de crescimento, as linhagens escolhidas para esta nova etapa de prospecção (SR05, SR31 e SR41) foram acompanhadas por 96 h onde se realizou leituras em espectrofotômetro à cada 24 horas para determinação do crescimento (gráfico 4).

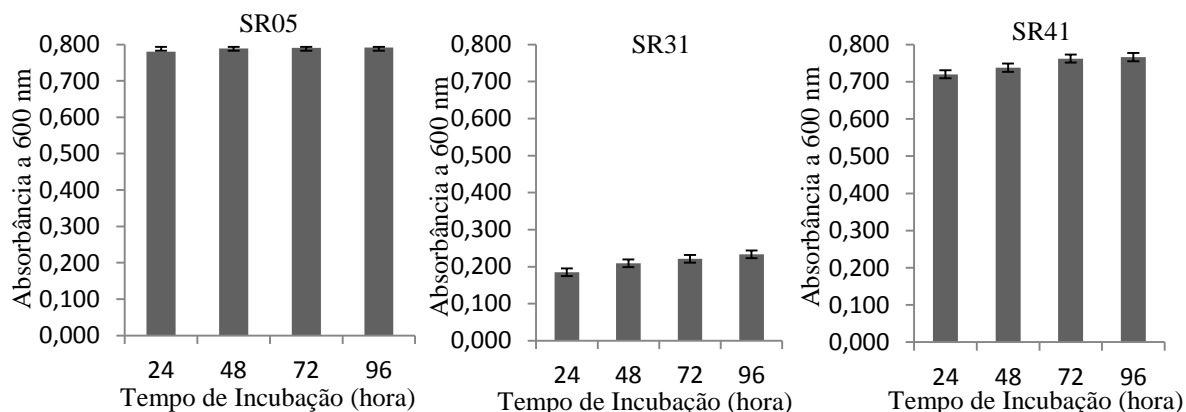


Gráfico 4. Avaliação do crescimento das linhagens SR05, SR31 e SR41 por espectrofotometria a 600nm durante quatro dias em meio CMC com pH 7,2.

4.5 Quantificação de Carboidratos e Análise Proteômica

Com o objetivo de verificar a degradação celulósica nos sobrenadantes remanescentes das culturas das linhagens celulolíticas de interesse (SR05, SR31 e SR41) a partir dos açúcares gerados, realizou-se a dosagem de açúcares redutores solúveis totais utilizando-se o reagente DNS. Dentre as três linhagens, a SR05 apresentou os maiores valores, seguida da linhagem SR31 e por último a linhagem SR41 que apresentou uma curva peculiar se comparada às demais linhagens. Na curva de calibração de dosagem de açúcares redutores totais, foi encontrado coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9957 e a seguinte equação da reta: $y = 1,8811x + 0,2007$ (Gráfico 3).

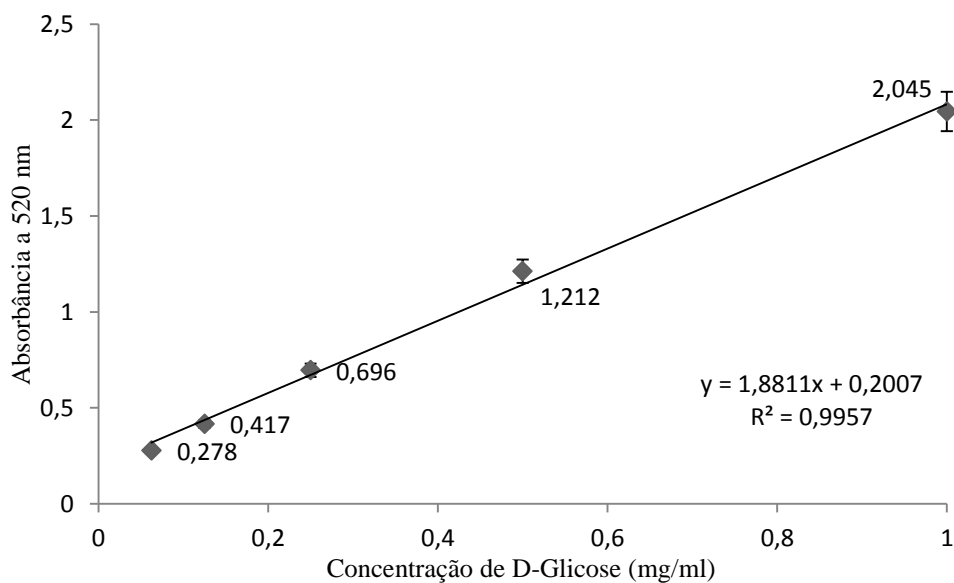


Gráfico 5. Curva padrão para a dosagem de açúcares redutores à partir de concentração de D-Glicose, utilizando-se a metodologia de Miller.

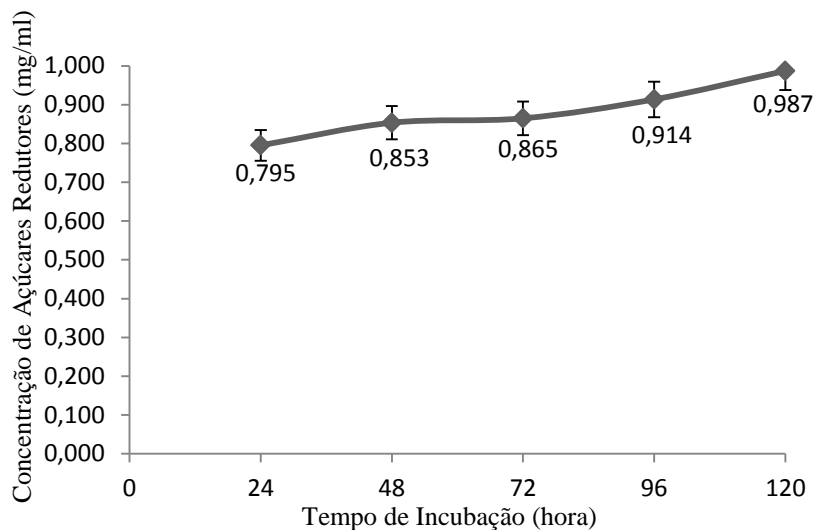


Gráfico 6. Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR05 ao longo de 120 horas.

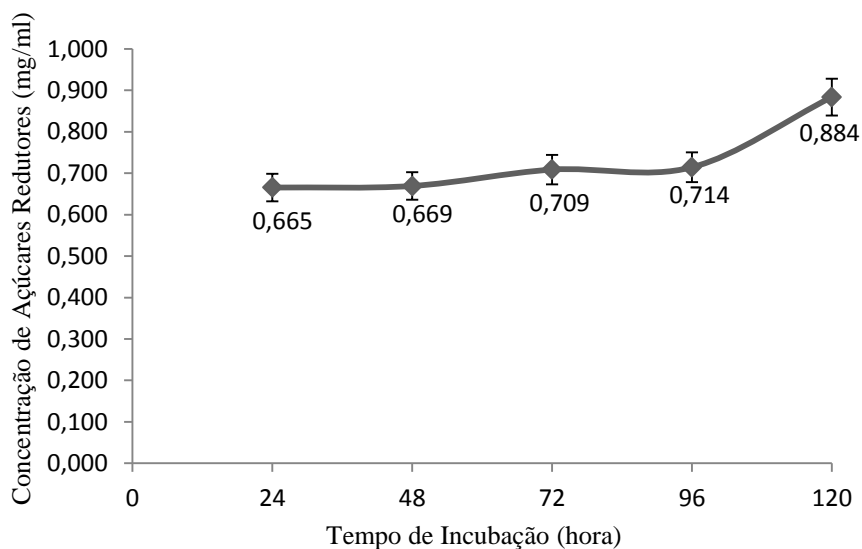


Gráfico 7. Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR31 ao longo de 120 horas.

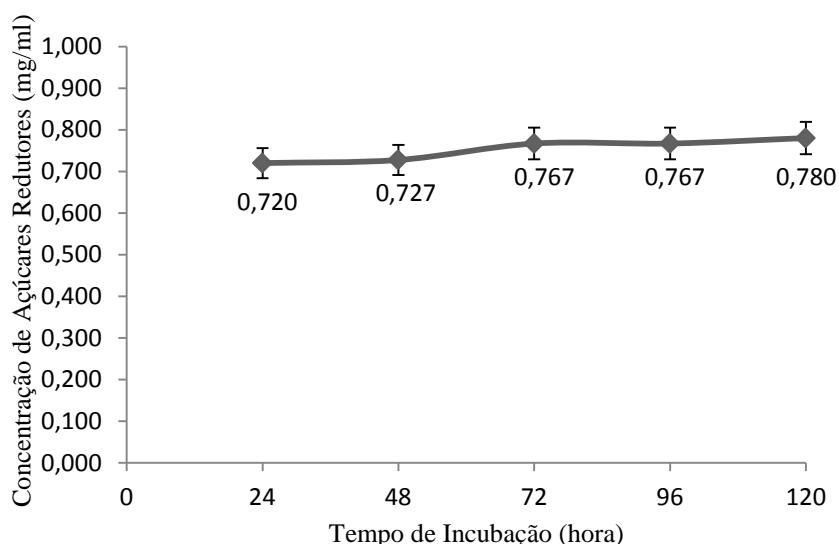


Gráfico 8. Dosagem de açúcares redutores totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR41 ao longo de 120 horas.

Também foi dosada a concentração de proteínas nos sobrenadantes das culturas com o objetivo de correlacionar o nível proteico com as concentrações de açúcares encontrados (gráficos 4-6), levando ainda em consideração as curvas de crescimento obtidas para cada linhagem (gráfico 2). A dosagem de proteínas solúveis na linhagem SR05, diferentemente do padrão observado para a SR31 e SR41, apresenta uma curva que indica uma saturação de proteínas solúveis totais no meio (gráficos 8-10). Tal fenômeno se explica, parcialmente, pelo fato de que a linhagem SR05 é a que tem melhor curva de crescimento, atingindo a fase estacionária de crescimento bacteriano (o crescimento desta linhagem foi acompanhada de uma em uma hora durante 24 horas) mais rapidamente se comparada com as demais, enquanto que em períodos de incubação de 72 a 96 horas as linhagens SR31 e SR41 ainda estão em crescimento (portanto, os açúcares redutores quebrados por ação das celulasas são rapidamente englobados e metabolizados) o que explica a baixa absorvância em 600 nm da linhagem SR31 apesar da alta concentração de proteínas totais solúveis, combinada com uma baixa concentração de açúcares redutores disponíveis no meio quando comparada às demais linhagens.

A curva de calibração de dosagem de proteínas solúveis totais, obteve o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9742 e a seguinte equação da reta: $y = 0,889x + 0,3496$ (Gráfico 7).

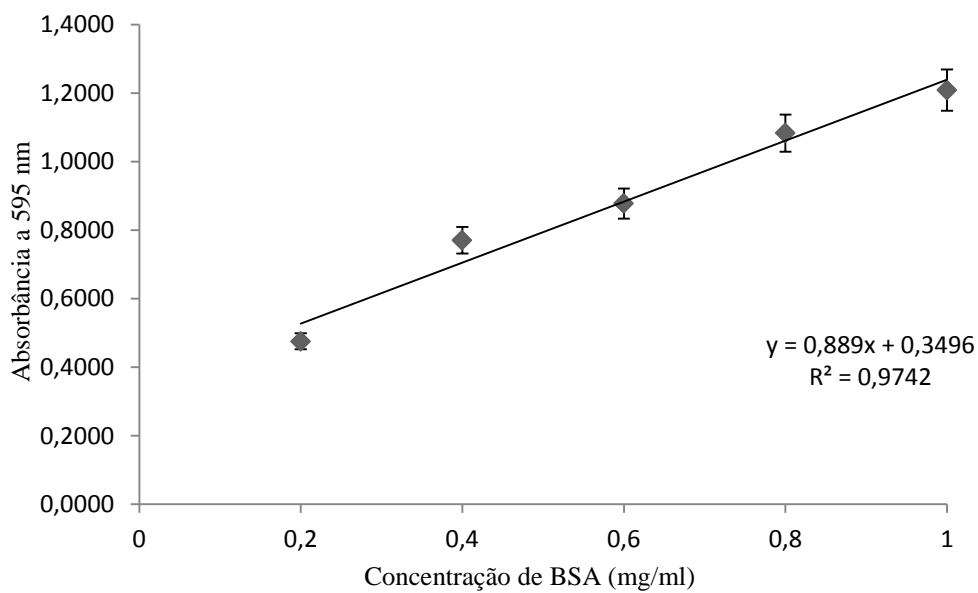


Gráfico 9. Curva padrão para a dosagem de proteínas solúveis totais a partir de concentrações de BSA, utilizando-se a metodologia de Bradford.

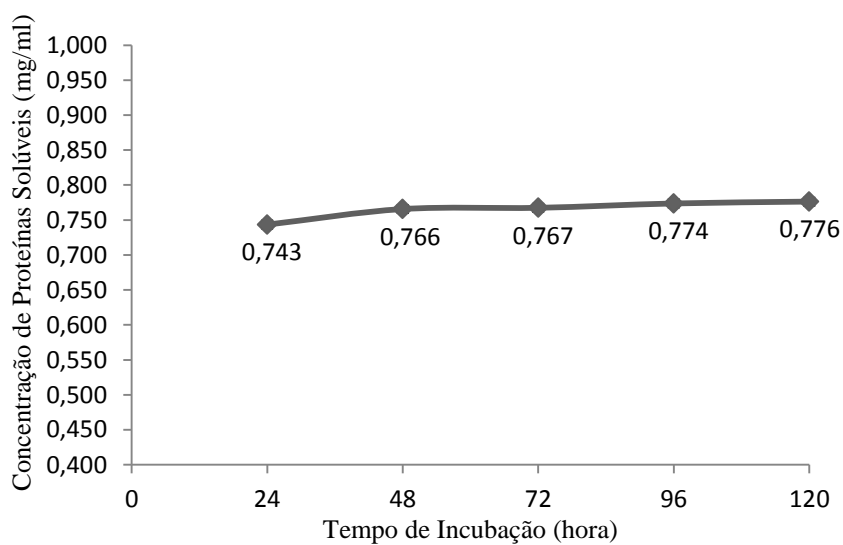


Gráfico 10. Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR05 ao longo de 120 horas.

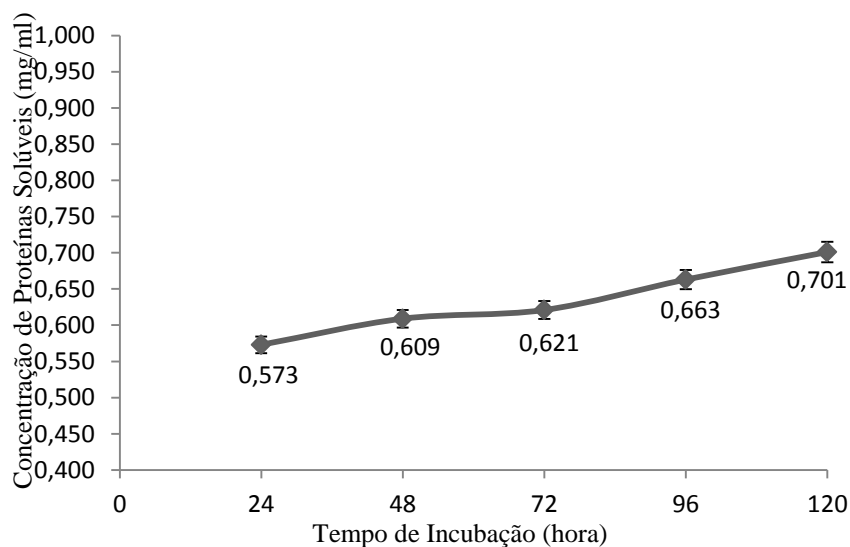


Gráfico 11. Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR31 ao longo de 120 horas.

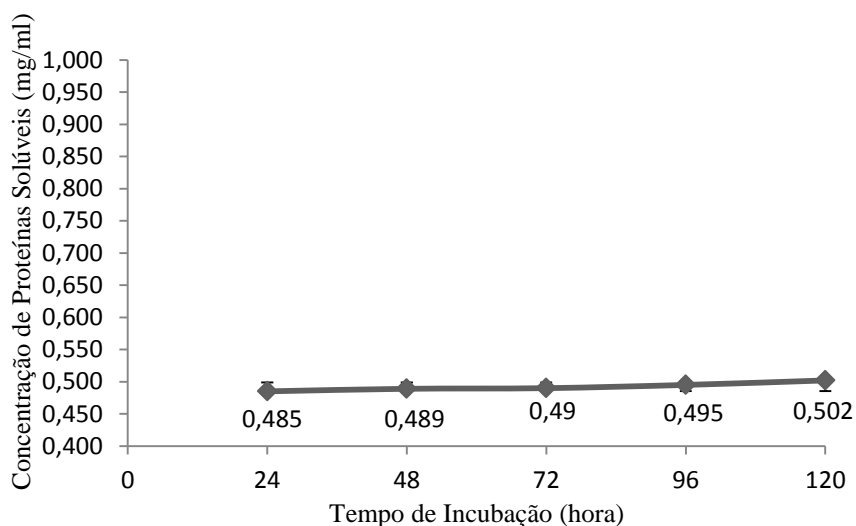


Gráfico 12. Dosagem de proteínas solúveis totais no sobrenadante do cultivo em meio líquido da linhagem SR41 ao longo de 120 horas.

A catálise específica do polímero de celulose em diferentes pHs (5,7 e 9) indicou diferenças na faixa de pH ótimo das celulasas secretadas pelas linhagens SR05, SR31, SR41. Tal atividade específica foi inferida a partir da quantificação dos açúcares redutores liberados após a reação por 10 minutos dos extratos enzimáticos brutos (gráfico 11).

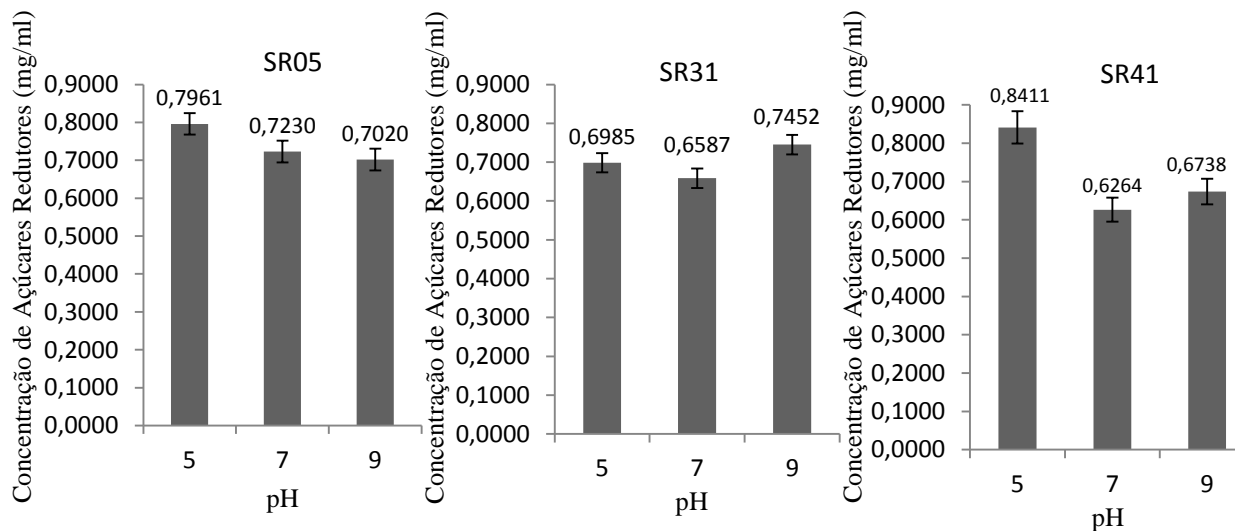


Gráfico 13. Dosagem dos açúcares redutores totais liberados após reação dos extratos enzimáticos extracelulares das linhagens SR05, SR31 e SR41 em diferentes pHs com uma solução de CMC a 4% a 50 °C por 10 minutos.

4.6 Peril Proteico do Sobrenadante do Cultivo de Linhagens Celulolíticas

Amostras do lisado bacteriano obtido nos cultivos em caldo marinho e em meio de indução de celulasas para as linhagens SR05, SR31 e SR41 foram submetidas à análise em eletroforese SDS-PAGE 12,5% bem como o precipitado do sobrenadante do cultivo em meio líquido contendo CMC das linhagens supracitadas (figura 10). No experimento de separação eletroforética, observou-se bandas proteicas na mesma faixa de peso molecular que as proteínas de interesse. Apesar da baixa concentração de proteínas no sobrenadante das culturas (o que é compatível haja vista que a única fonte de proteínas nativas são os mecanismos de secreção enzimática bacteriana), bandas proteicas muito semelhantes àquelas presentes nos estados de indução se mostraram presentes no gel: Para a linhagem SR05, nas proteínas intracelulares totais no cultivo em Caldo Marinho é possível observar uma banda proteica proeminente com peso aproximado de 33 kDa, no estado de indução muitas das proteínas intracelulares não são observáveis contudo persiste a mesma banda proteica próxima à região de 33 kDa e esta mesma proteína é encontrada no sobrenadante do cultivo em CMC, sendo, portanto, potencialmente a celulase de interesse na linhagem SR05. O mesmo é observado nas linhagens SR31 e SR41, apesar do perfil eletroforético diferente, pode-se observar na

linhagem SR31 tanto no extrato proteico intracelular originário do cultivo em Caldo Marinho, quanto do cultivo em CMC, uma banda conspícua próxima à região de 35 kDa e no sobrenadante uma banda na região de 33 kDa, já na linhagem SR41 poucas bandas na região de 30 à 40 kDa com o aparecimento de duas banda muito próximas na região dos 45 kDa, tais dados sugerem uma diversidade molecular entre as hidrolases extracelulares de interesse, o que reflete a alta diversidade molecular das próprias celulases que, apesar de possuírem massa molecular média em torno de 35 kDa são extremamente diversas quanto à sua massa em condições ótimas de catálise (BHALLA et al., 2013).

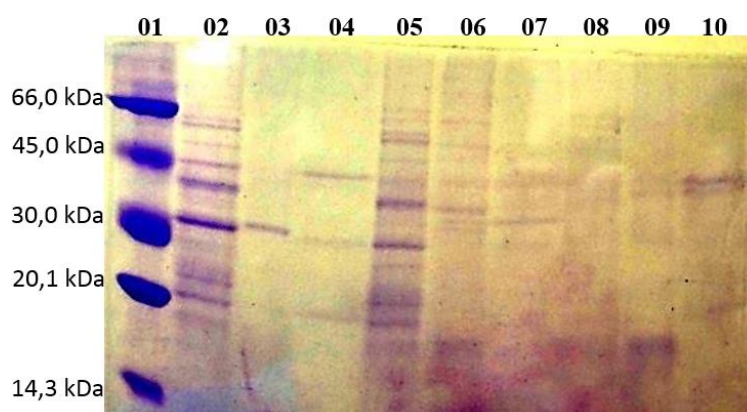


Figura 10. Eletroforese vertical em poliacrilamida 12,5%. 01 – Padrão de Peso Molecular (GE Healthcare); 02, 05 e 08 – Extrato proteico obtido a partir do lisado celular originário do cultivo em Caldo Marinho da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente; 03, 06 e 09 – Extrato proteico obtido a partir do lisado celular originário do cultivo em CMC da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente; 04, 07 e 10 – Conteúdo proteico do sobrenadante do meio CMC da linhagem SR05, SR31 e SR41 respectivamente.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- O grupo mais representativo de microrganismos estudados foi constituído de bacilos Gram positivos os quais representaram o maior percentual de bactérias com atividade celulolítica extracelular;
- A maioria dos isolados estudados apresentaram como faixa ótima de crescimento valores de pH acima de 7,0;
- Uma linhagem isolada do coral com pigmentação alterada (SR09) foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *Vibrio harvey*;
- Os experimentos em SDS-PAGE revelaram proteínas solúveis extracelulares compatíveis com os dados da literatura para as celulases;
- Como perspectiva futura, o presente trabalho poderá servir de base para analisar a expressão e presença de outras moléculas bioativas extracelulares de origem bacteriana. Além de indicar linhagens potenciais para estudos de prospecção biotecnológica por celulases e proteases mais pormenorizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, I., VAN SCHELTINGA, A. C. T., VALEGÅRD, K. Towards new β -lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1897–1906, 2001.

ARAUJO, G. H. 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. Dissertação de Mestrado. UFPB. 2013

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 5ªed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

BEN-HAIM, Y., ZICHERMAN-KEREN, M., ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Envir. Microbiol.* 69, 4236–4242, 2003.

BOURNE, D.G., MUNN, C.B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environ Microbiol* 7: 1162–1174, 2005.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M., SANI, R.K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresour Technol.* V., p.128. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 — 254. 1976.

BURKHOLDER, P.; PFISTER, R.; LEITZ, F. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl. Microbiol.* 14:649–653, 1966.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bull, mar. Science*, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2001.

COSTA, C. F. Estudo eco-fisiológico e molecular dos dinoflagelados simbioses de *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) dos ambientes recifais do Cabo Branco, Paraíba – Brasil, sob condições de estresses naturais e provocados artificialmente. Tese de Doutorado em Zoologia. 156p. UFPB, João Pessoa, 2006.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; DEN BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260, 1997.

CHERIF, A. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *Entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 990-1000, 2003.

DUSTAN, P. Distribution of zooxanthellae and photosynthetic chloroplast pigments of the reef-building coral *Montastrea annularis* Ellis and Solander in relation to depth

on a West Indian coral reef. *Bull. Mar. Sci.*, 29:79-95, 1979.

FREITAS, M.V. Hartt: Expedições pelo Brasil Imperial 1865-1878. São Paulo: Metalivros. 244 p, 2001.

GERHARDT, P.; MURRAY R.G.E.; HOOD W.A.; KRIEG N.R. Methods for general and molecular bacteriology. ASM Press, Washington, p.179-215, 1994.

GODFREY, T. Textiles. In: GODFREY, T; WEST, S. editors. Industrial enzymology. 2nd ed. London: Macmillan Press, 1996. pp. 360–71.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 73. 2007.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* V. 38. P. 135-141. 2007

HAIKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology.* V. 89, p. 17-34, 2003.

HARVELL, *et al.* Climate and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2162, 2002.

JACKSON, *et al.* Historical over-fishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293, 629–637, 2001.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology.* v. 16, p. 396-403, 1998.

JANSSON, J. K.; PROSSER, J. I. Microbiology: The life beneath our feet. *Nature.* v. 494. P. 40-41. 2013.

KALLMEYER, J.; POCKALNYC, R.; DHIKARIA, R. R.; SMITH, D. C.; D'HONDTC, S. Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment. *PNAS.* 2012.

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

KUSHMARO, A., LOYA, Y., FINE, M., ROSENBERG, E. Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* 380, 396, 1996.

KUSHMARO, A., ROSENBERG, E., FINE, M., LOYA, Y. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 147, 159–165, 1997.

KNOWLTON, N., ROHWER, F. Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. *Am Nat* 162: S51–S62, 2003.

LABOREL, J. Madreporaires et hydrocoralliaires récifaux des cotes brésiliennes. Rés

Sci Camp Calypso, v.9, n.25, p. 171-229, 1970.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature* 227, 680 — 685. 1970.

LIMA, W.S.G. Geologia e Geomorfologia dos Recifes de Maracajaú-RN e plataforma rasa adjacente. Dissertação de Mestrado. UFRN, Natal. 2002.

LUNA, G. M., BIAVASCO F., DANOVARO R. Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environmental Microbiology*. 9: 1851–1857, 2007.

LUNA, G. M., BONGIORNI L., GILI C., BIAVASCO F., DANOVARO, R. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Environmental Microbiology Reports*. 2: 120–127, 2010.

MALDONADO, L. A.; FENICAL, P. R.; JENSEN, C. A et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 55. P.1759–1766. 2005.

MEDEIROS, D. S. Diversidade das bactérias associadas a cnidários sadios e doentes dos recifes costeiros da Paraíba. Relatório Parcial PIBIC. UFPB. 2012.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* v. 31, p. 426-428. 1959.

MMA: Ministério do Meio Ambiente. Recifes de corais no Brasil. 2006

MONDOL M.A.M., Kim J.H., Lee M.A., Tareq F.S., Lee H.S., Lee Y.J., Shin H.J. Ieodomycins A–D, antimicrobial fatty acids from a marine *Bacillus* sp. *J. Nat. Prod.* 2011;74:1606–1612. 2013.

NAKANISHI, Y. An isolation agar medium for cholerae and enteropathogenic halophilic vibrios. *Modern Media*, 9; 246, 1963.

NEVES, E.G., ANDRADE, S.C.S, da SILVEIRA, F.L., SOLFERINI, V.N. Genetic variation and population structuring in two brooding coral species (*Siderastrea stellata* and *Siderastrea radians*) from Brazil. *Genetica* 132: 243-254, 2008.

PRIEST, F. G. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria, p. 27–56. In C. R. Harwood (ed.), *Bacillus*. Plenum Press, New York, NY. 1989.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; CHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 62, p. 597-635, 1998.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.*, v.57

RIBEIRO, A. R. P. *Bacillus* – revisão bibliográfica. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ihéus, 2011. (Apostila) Disponível em:

<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAe4vAAG/bacillus>> Acessado em: Janeiro, 2011.

ROHWER, F., BREITBART, M., JARA, J., AZAM, F., KNOWLTON, N. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastrea franksi*. *Coral Reefs* 20: 85–91, 2001.

ROHWER, F., KELLEY, S. Culture-independent analyses of coral-associated microbes. Em: *Coral Health and Disease*. Rosenberg, E., and Loya, Y. (eds). Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 265–278, 2004.

ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R., ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 5: 355–362, 2007.

SCHULZ, D. Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SEBENS, K. Biodiversity of coral reefs: what are we losing and why? *Amer. Zool.* 34, 115–133, 1994.

SHARMA, D.; SHARMA, B. SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*. v. 10, n.1, p. 23-40, 2011.

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of Microbiology Methods*. V. 6, p. 123-137. 1987

SMIBERT, R. M., KRIEG, N. R. Caracterização fenotípica. Em: GERHARDT, P., MURRAY, R. G., WOOD, W. A., KRIEG, N. R., (Editores). *Métodos para bacteriologia geral e molecular*. Sociedade Americana de microbiologia, Washington, D. C, pp. 607-654, 1994.

SOLIMAN, N. A. Coproduction of thermostable amylase and β -galactosidase enzymes by *Geobacillus stearothermophilus* SAB-40: Application of placket-burman design to evaluate culture requirements affecting enzyme production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 18, n.4 p. 695-703, 2008.

SZMANT, A. M. Nutrient enrichment on coral reefs: is it a major cause of coral reef decline? *Estuaries* 25, 743–766, 2002.

TEATHER, R.M., WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 777–780, 1982.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. v. 6,

n. 9, p. 1-23, 2007.

WILKE, M. S., LOVERING, A. L., STRYNADKA N. C. J. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8:525–533, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Rev Microbiol.* V.51, n.2, p.221-271, 1987.

WRIGHT, V.P. & BURCHETTE, T.P. Shallow-water carbonate environments. In: Reading, H.G. (ed), *Sedimentary environments: processes, facies, stratigraphy.* (Blackwell Scientific Publications) Chapter 9: Oxford, p.325-394. 1996.

ANEXO



27º CBM Congresso Brasileiro de Microbiologia

Certificada

Certificamos que o trabalho intitulado CELLULOLYTIC AND PROTEOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA ISOLATED FROM CORAL SIDERASTREA STELLATA. com a autoria de: SANTOS, Y. Q., MEDEIROS, D. S., ARAUJO, G. H., GORLACH-LIRA, K. foi apresentado na forma de pôster durante o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2013.

De 29 de Setembro a 3 de Outubro de 2013 - Centro de Convenções de Natal - RN

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente

Prof. Dra. Carla Tacdei de Castro Neves
1º Secretário

Eventos paralelos:

- II Simpósio Iberoamericano sobre Micro-organismos Fotoesintetizantes
 - XV Simpósio Brasileiro de Microbactérias
 - II Simpósio de Fermentação Alcolólica
- I Brazilian Microbiome Workshop and II Brazilian Microbiome Project Meeting
- IV Simpósio de Coleções de Cultura

Organização e realização



