

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE RIZOBACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS DE MUNICÍPIOS CIRCUNVIZINHOS DE MANAUS/ MAZONAS

Ellem Suane Ferreira ALVES¹

Luiz Antonio de OLIVEIRA²

Fabiana da Rocha OLIVEIRA³

¹Bolsista Iniciação científica INPA-PIBIC/CNPq;

²Colaborador/Pesquisador INPA;

³Orientadora, Bolsista FIXAM/FAPEAM.

INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune desencadeada pela ingestão de cereais que contêm glúten, por indivíduos geneticamente predispostos (Sverker *et al.* 2005). Vários fatores epidemiológicos, como o aumento de casos diagnosticados, mudanças na apresentação da doença com o aparecimento de formas atípicas, assim como o fato de acometer pessoas de qualquer idade, contribuem para que a DC seja considerada um problema relevante em termos de saúde (Fasano e Catassi 2001; Casellas *et al.* 2008). Até o ano de 1970, acreditava-se que a prevalência da DC na população geral fosse de 0,03% (Tack *et al.* 2010), no entanto, este valor aumentou significativamente e encontra-se em torno de 1-2%, com uma distribuição bastante homogênea em todo o mundo (Rodrigo Saez *et al.* 2011).

O único tratamento eficaz para a doença celíaca, em todas as formas clínicas, é o dietético, devendo-se excluir o glúten da alimentação durante toda a vida. Buscando uma alternativa de tratamento para a doença em questão, muitos micro-organismos, tais como, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas foram identificadas com ação proteolítica do glúten (Oliveira 2014). Algumas dessas rizobactérias, como os rizóbios são gram-negativas, em forma de bastonetes, que além de fixarem o nitrogênio atmosférico quando associados simbioticamente a espécies vegetais leguminosas, apresentam-se como vantajosos produtores de enzimas para os mais diversos fins biotecnológicos (Costa 2011).

Em vista disso, no presente trabalho foram realizados experimentos em condições de laboratório a fim de se isolar rizobactérias para seleção daquelas com maior potencial de degradação do glúten em meios de cultivos sólido e líquido. Além disso, foi possível observar o crescimento bacteriano e avaliar a eficiência da atividade proteolítica a partir dos extratos brutos obtidos por meio de diferentes choques térmicos, visando o interesse para a saúde pública na sua utilização futura em benefício das pessoas celíacas, com base no possível uso desses micro-organismos e/ou de seus metabólitos na bioindústria.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados bacterianos foram obtidos de nódulos de raízes de leguminosas coletadas às margens de estradas federais (em municípios circunvizinhos de Manaus / Amazonas) e dentro de reservas pertencentes ao INPA. Em cada ponto de coleta foram obtidas as devidas coordenadas geográficas.

Em laboratório, cada nódulo foi lavado com etanol (92%) por 3 minutos, seguido por uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio por 4 minutos e dez lavagens com água estéril. Em seguida, cada nódulo foi pressionado com auxílio de espátula estéril em uma placa e, posteriormente, estriado com alça bacteriológica em placa de Petri contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar) esterilizado, que consiste em 10g

Manitol, 0,5g K_2HPO_4 , 0,2g $MgSO_4$, 0,1g NaCl, 0,5g extrato de levedura, 15g Ágar em 1 L de água destilada, pH 7 (Vincent 1970). As placas com os isolados foram incubadas a 26 ± 2 °C até o crescimento das colônias e, posteriormente, reisoladas e repicadas para novas placas contendo YMA para obtenção de colônias puras.

Os isolados de rizobactérias obtidos foram testados em meio de cultura sólido YMA, onde se substituiu o manitol pelo glúten (10g glúten, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2g $MgSO_4$, 0,1g NaCl, 0,5g extrato de levedura, 15g Ágar em 1 L de água destilada, pH 7). O meio foi esterilizado a 120 °C por 15 minutos em autoclave e, posteriormente, colocados em placas de Petri esterilizadas. Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma porção da colônia bacteriana, realizando-se um leve toque no meio de cultura sólido, em quatro repetições em cada placa. As placas foram incubadas a 26 ± 2 °C e avaliadas quanto à presença de halo transparente ao redor das colônias após um período de quatro dias. A avaliação da atividade proteolítica se deu por meio do índice enzimático ou Índice de Degradação do Glúten (IDG) para cada isolado, pela fórmula: DD (média do diâmetro da zona de degradação em mm) / DC (média do diâmetro da colônia em mm), adaptando-se aos critérios e cálculos de Berraquero *et al.* (1976) e metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975). Com base nos índices, os isolados foram classificados, de acordo com a capacidade de degradação do glúten, em: baixa ($IDG < 2$), média ($2 \leq IDG < 4$) e alta ($IDG \geq 4$).

Os micro-organismos com os maiores IDGs foram testados quanto ao crescimento em meio líquido em três temperaturas (26 °C, 36 °C e 56 °C) e em duas formulações de fontes de carbono: a) 0,2% de glúten (meio G) (0,2% glúten, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4$, 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura em 1L de água destilada); b) 1,0% de manitol + 0,2 % de glúten (meio MG). Um volume de 50 mL de cada meio foi adicionado em erlenmeyers com capacidade de 125 mL e esterilizados a 120 °C por 15 min. Cada um dos micro-organismos selecionados (concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL³ - tempo 0) foi inoculado em triplicata e colocados sob agitação constante em incubadoras a 26, 36 e 56 °C, separadamente. Uma alíquota de 2mL do caldo foi retirada após 24h (tempo 1), 48h (tempo 2), 72h (tempo 3) e 96h (tempo 4) e armazenadas a -20 °C para posterior leitura em espectrofotômetro para avaliação do crescimento bacteriano.

Um total de 15 mL de todas as amostras obtidas no meio líquido também foi retirado a cada 24h durante um período de 4 dias e armazenados em tubos Falcon, com a finalidade de obter os extratos brutos para a detecção de metabólitos com atividade proteolítica. Para isso, cada amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana *Millipore* 0,22 μ m, armazenado em microtubos e mantidos a 4 °C. Um total de 100 μ L de cada amostra do extrato bruto foi depositado em 4 poços (6 mm cada) perfurados em placas com meio ágar-glúten e incubadas a 26 e 36 °C, separadamente. Após isso, as amostras foram avaliadas a cada 24h por um período de 4 dias quanto ao tamanho dos halos de transparência, que foram medidos com um paquímetro digital (Oliveira, 2014).

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias dos diferentes tratamentos, pelo programa *Assistat* versão 7.7 beta.

As amostras que apresentaram eficiência quanto à capacidade de degradação do glúten nas temperaturas do teste anterior (26 e 36 °C) foram testadas também em diferentes valores de temperatura (46, 56, 66, 76, 86 e 96 °C). Um total de 500 μ L de cada extrato foi adicionado em microtubos de 1,5 mL e incubado separadamente em *Thermomixer* em cada uma das temperaturas citadas por 10 minutos. Após isso, 100 μ L de cada extrato foram adicionados em 4 poços (6 mm cada) distribuídos em meio ágar-glúten e incubados a

26 ± 2 °C. A avaliação foi realizada a cada 24h por um período de 4 dias, observando a presença/ausência de halos de transparência e feitas as devidas medições com o auxílio de paquímetro digital.

Os isolados positivos quanto à degradação do glúten em meio de cultura sólido foram submetidos ao teste de identificação da morfologia bacteriana pela coloração Gram, seguindo o protocolo do conjunto para coloração de Gram (4 x 500mL – violeta genciana, lugol, solução descolorante álcool-acetona e fucsina fenicada da LaborClin).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 164 rizobactérias de nódulos de leguminosas e adicionadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia e Microrganismos de Solos da Amazônia (INPA). Desses isolados, 35 cresceram e formaram halos de transparência em meio de cultura sólido contendo glúten, os quais, 10 isolados apresentaram índices enzimáticos altos (IDG≥4), 24 isolados com índices médios (2≤IDG<4) e apenas um isolado mostrou índice baixo (IDG<2) (Tabela 1, Figura 1). Sendo assim, é possível inferir que esses microrganismos mostraram habilidade no crescimento e na degradação do glúten, utilizando-o como fonte de carbono de forma eficiente.

Tabela 1. Índice de degradação do glúten dos isolados bacterianos em meio sólido após incubação a 26 ± 2 °C.

Isolados	DD	DC	IDG	Isolados	DD	DC	IDG	Isolados	DD	DC	IDG
	-----mm-----				-----mm-----				-----mm-----		
INPA 959	9,77	2,45	4,11	INPA 1000	10,50	5,15	2,04	INPA 1025	8,56	4,14	2,10
INPA 960	10,70	2,60	4,22	INPA 1001	9,14	4,54	2,02	INPA 1028	10,50	5,28	2,00
INPA 961	12,90	3,15	4,20	INPA 1002	9,38	3,42	2,75	INPA 1029	14,30	4,29	3,35
INPA 962	9,93	2,52	4,05	INPA 1004	9,26	4,56	2,03	INPA 1030	11,00	3,47	3,20
INPA 963	11,10	2,66	4,24	INPA 1005	10,20	4,98	2,06	INPA 1032	11,70	3,45	3,40
INPA 964	10,80	2,60	4,16	INPA 1006	10,20	4,63	2,24	INPA 1034	9,56	3,35	2,87
INPA 965	13,20	3,24	4,17	INPA 1008	9,76	4,85	2,03	INPA 1035	11,50	3,45	3,36
INPA 966	5,07	1,56	4,22	INPA 1018	11,10	5,38	2,07	INPA 1044	1,28	2,37	0,55
INPA 967	13,6	3,41	4,31	INPA 1019	10,90	4,81	2,42	INPA 1053	7,10	3,57	2,04
INPA 968	9,90	2,50	4,02	INPA 1020	11,10	5,38	2,07	INPA 1055	8,86	3,03	2,94
INPA 997	11,7	5,83	2,06	INPA 1022	10,60	4,66	2,27	INPA 1059	10,90	3,28	3,36
INPA 998	6,11	3,17	2,09	INPA 1023	5,98	2,99	2,14	-	-	-	-

Obs: DD: Média dos diâmetros da zona de degradação, DC: Media dos diâmetros das colônias, IDG: Índice de degradação do glúten.

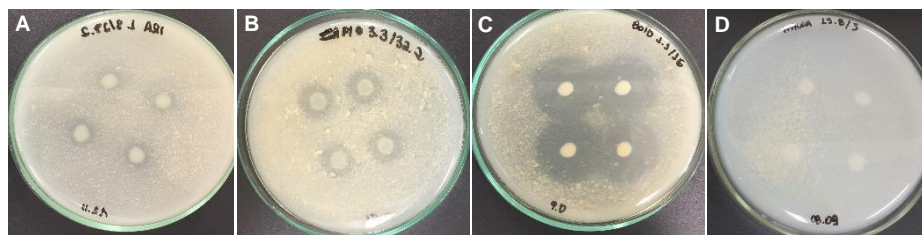


Figura 1. Rizobactérias de nódulos de leguminosas.

Os 10 isolados que apresentaram alto índice de degradação enzimática (INPA 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967 e 968) foram utilizados para os testes quanto ao crescimento em meio líquido MG (manitol + glúten) e G (glúten) em duas temperaturas (26 °C e 36 °C), onde se observou um melhor crescimento em meio MG a 26 °C para a maioria dos isolados (Tabela 2). De acordo com os dados obtidos, as rizobactérias tiveram um melhor crescimento no meio líquido no qual havia dois tipos diferentes de fontes de carbono, isto é, o meio com manitol e glúten. A presença de carbono e nitrogênio favoreceu para um ambiente rico e diverso, inclusive mais parecido com o ambiente natural das rizobactérias, possibilitando um metabolismo mais eficiente para essas bactérias. Naturalmente, compostos químicos que possuem carbono e nitrogênio em sua composição podem ser fontes de nutrientes para o crescimento microbiano presente na rizosfera (Bais *et al.* 2006). Esses nutrientes são encontrados em abundância nos solos das florestas favorecendo a diversidade de micro-organismos, que podem ter inúmeras funções biológicas, incluindo, as interações com plantas que mostram muitas vezes um efeito positivo (Figueiredo *et al.* 2007). Com toda essa diversidade, a possibilidade da existência de genes com propriedades funcionais novas são gigantescas, principalmente quando se compara micro-organismos dos solos amazônicos, onde a luta por sobrevivência é maior (Vale Júnior *et al.* 2011). Por isso, a qualidade destes organismos que apresentam características diferenciadas se destaca.

Na tabela 2 é possível observar as médias dos halos de degradação do glúten pelas proteases presentes nos extratos brutos dos isolados incubados em meio ágar-glúten a 26 e 36 °C, em que os metabólitos produzidos pelas bactérias INPA 959, 962, 964, 965, 967, 968 cultivadas nos dois meios líquidos (MG e G) formaram halos de degradação até 96h de cultivo. O que se pode considerar é que as bactérias quando cultivadas nos dois meios líquidos e em ambas as temperaturas produziram metabólitos capazes de degradar o glúten e os liberaram para o meio extracelular. Somente os extratos brutos de INPA 963 foram positivos ao meio MG e negativo para meio G. Os isolados INPA 960, 961 e 966 foram negativos nos dois meios de cultivo.

Segundo análises estatísticas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, o extrato bruto do isolado INPA 962 foi o que apresentou a melhor atividade proteolítica em 36 °C quando cultivado em meio MG, enquanto que o extrato bruto do isolado INPA 965 apresentou melhor degradação do glúten em 26 °C quando cultivado no mesmo meio líquido. Em relação ao meio de cultivo, o melhor para a maioria dos isolados quanto à produção de proteases foi o meio MG e a melhor temperatura de 26 °C. Aqueles isolados que foram cultivados em até 96h foram os que produziram uma maior quantidade de metabólitos proteolíticos (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Avaliação da atividade proteolítica dos metabólitos presentes nos extratos brutos dos isolados de rizobactérias obtidos por meio de diferentes meios, temperaturas e tempo de cultivo.

Extrato bruto	Meio de cultivo		Temperatura		Tempo			
	MG	G	26 °C	36 °C	24h	48h	72h	96h
	-----mm-----		-----mm-----		-----mm-----			
INPA 959	2,70 eB	7,84 aA	5,28 cA	5,26 cA	0,00 eD	4,53 dC	7,86 cB	8,71 bA
INPA 962	7,66 bcA	7,85 aA	8,09 bA	7,42 bB	0,00 eD	8,19 bC	9,73 bB	13,12 aA
INPA 963	5,48 dA	0,00 cB	5,48 cA	0,00 gB	2,24 dB	2,54 eB	2,77 eB	3,42 eA
INPA 964	10,79 aA	8,09 aB	9,14 aB	9,76 aA	4,08 bD	9,90 aC	11,10 aB	12,71 aA
INPA 965	7,44 cA	5,90 bB	9,59 aA	3,74 dB	5,11 aC	6,28 cB	7,52 cA	7,75 cA
INPA 967	8,12 bA	0,00 cB	5,71 cA	2,41 fB	3,27 cB	4,10 dA	4,42 dA	4,46 dA
INPA 968	7,41 cA	0,00 cB	4,42 dA	2,99 eB	2,79 cdB	3,85 dA	4,01 dA	4,19 dA

Obs.: Dados estatísticos obtidos pela análise de variância, aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Meio de cultivo G (0,2% glúten) e MG (1,0% manitol + 0,2% glúten). Avaliação da atividade proteolítica em meio sólido contendo 1,0% de glúten após incubação a temperatura ambiente por quatro dias.

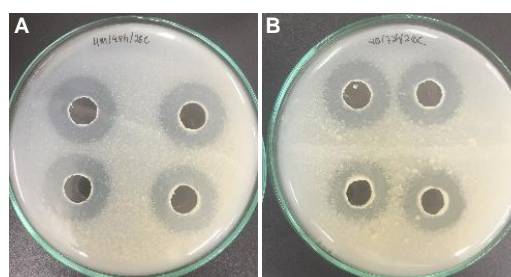


Figura 2. Atividade proteolítica dos extratos brutos obtidos do isolado INPA 962 cultivado em meio: (A) MG a 26 °C por 48h e (B) meio G a 26 °C por 72h, evidenciada pelos halos de transparência em meio sólido contendo 1,0% de glúten após incubação a 26 °C por quatro dias.

Os extratos brutos dos 7 isolados positivos no teste anterior foram testados também quanto ao choque térmico nas temperaturas de 46 a 96 °C. Apenas os extratos brutos dos isolados INPA 959 e 964 apresentaram atividade proteolítica em meio ágar-glúten nas temperaturas de 46, 56 e 66 °C. Quando os extratos brutos foram expostos às temperaturas de 76, 86 e 96 °C, perderam suas propriedades enzimáticas, sugerindo que nessas temperaturas seus sítios ativos foram desativados (dados não mostrados).

De acordo com o teste de coloração GRAM, todas as rizobactérias testadas apresentaram-se Gram-negativas e na forma de bastonete, o que pode caracterizar rizóbio, mas que serão confirmados com os testes moleculares.

CONCLUSÃO

Mais de 20% das rizobactérias isoladas apresentaram habilidade em degradar o glúten (INPA 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 997, 998, 1000, 1001, 1002, 1004, 1005, 1006, 1008, 1018, 1019, 1020, 1022, 1023, 1025, 1028, 1029, 1030, 1032, 1034, 1035, 1044, 1053, 1055 e 1059). Entre as quais, dez (INPA 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967 e 968) destacaram-se pelo alto índice enzimático, enquanto para a maioria desses isolados, o melhor crescimento em meio de cultivo foi o MG a uma temperatura de 26 °C. Quanto à produção de metabólitos, apesar desses isolados evidenciarem elevado IDG,

somente os extratos brutos dos isolados INPA 959, 962, 964, 965, 967, 968 apresentaram atividade proteolítica em ambas as temperaturas e meios de cultivos testados, no entanto, somente os extratos brutos dos isolados INPA 959 e 964 apresentaram ação proteolítica no glúten entre as temperaturas de 46 e 56 °C, mas perderam essa habilidade entre as temperaturas de 66 a 96 °C.

Este trabalho mostrou que existem rizobactérias de nódulos de leguminosas com alta capacidade de degradação do glúten, portanto, é de suma importância a identificação taxonômica desses isolados bacterianos, além da purificação e caracterização dos metabólitos presentes nos extratos brutos para identificação molecular dessas proteases a fim de poder utilizá-las como alternativas para o tratamento da doença celíaca.

REFERÊNCIAS

- Berraquero, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17(4): 399-406.
- Casellas, F. *et al.* 2008. Factors impact health-related quality of life in adults with celiac disease: A multicenter study. *World J Gastroenterol*, 14(1): 46-52.
- Costa, F.M. 2011. *Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de guandu [(Cajanus cajan (L.) Millsp.), cultivado na borda oeste do Pantanal Sul - Mato - Grossense*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana. 87 pp.
- Fasano, A.; Catassi, C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120: 636-651.
- Hankin, L; Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607.
- Oliveira, F.R. 2014. *Potencial de degradação proteica por estirpes de Paenibacillus spp.* Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 104 pp.
- Sáez, R.L. *et al.* 2011. Differences between pediatric and adult celiac disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 103(5): 238-244.
- Sverker, A.; Hensing, G.; Hallert, C. 2005. Controlled by food – lived experiences of celiac disease. *J Hum Nutr Diet*, 18: 171-180.
- Tack, G.J.; Verbeek, W.H.M.; Schreurs, M.W.J.; Mulder; C.J.J. 2010. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature reviews Gastroenterol Hepatol*, 7(4): 204-213.
- Vincent, J.M. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook), London. 164 pp.