



***Atividades enzimáticas extracelulares de
microrganismos marinhos resistentes a TBT***

Kaori Levy da Fonseca

2013



***Atividades enzimáticas extracelulares de
microrganismos marinhos resistentes a TBT***

Kaori Levy da Fonseca

Trabalho de projeto apresentado à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, realizado sob a orientação científica do Doutor Marco Filipe Loureiro Lemos, Professor Adjunto da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria

Título: Atividades enzimáticas extracelulares de microrganismos marinhos resistentes a TBT.

Copyright © Kaori Levy da Fonseca

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King)

Agradecimentos

Na impossibilidade de nomear todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, não posso deixar de expressar a minha gratidão:

Ao meu Orientador, Doutor Marco Lemos, pelos conhecimentos transmitidos, que me permitiram evoluir ao longo desta etapa, e pela inteira disponibilidade demonstrada.

À ESTM-IPL pelas instalações facultadas, que facilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, do GIRM e aos técnicos pela ajuda e conhecimentos partilhados.

À Berinha, à Raquelis, à Ritinha, à Rainha Márcia e à Augusta, pela amizade e companheirismo.

A todos os meus amigos que me apoiaram, em especial à Illyane e à Eliane, pela compreensão e paciência inesgotáveis.

Aos meus pais e ao meu irmão por existirem e por fazerem de mim aquilo que sou.

E por fim a uma das pessoas mais importantes desta etapa da minha vida, por ontem, por hoje, e por tudo, Celso!

Abstract

Enzymes are the most remarkable and highly specialized proteins, presenting in most cases a catalytic efficiency much higher than the majority of synthetic catalyzers, being their industrial production mainly ensured by some species of microorganisms.

Microorganisms present in extreme environments ought to develop adaptation mechanisms to cope with adverse physico-chemical conditions or contaminated scenarios which may confer the potential to produce active and/or stable enzymes under those conditions, hence being able to produce extracellular enzymes with high biotechnological and industrial potential.

Tributyltin (TBT) despite the recent ban of its used in anti-fouling paints in boats is still a common contaminant in aquatic systems and has been considered to be one of the most toxic substances ever introduced into the marine environment.

TBT resistant microorganisms (able to grow at 3 mM TBT) from 7 Portuguese harbors were collected, isolated and then REP-PCR characterized, and chosen isolated identified by MALDI-TOF-MS. Their extracellular lipolytic and proteolytic activity was assessed. Lipolytic extracts were used in tests for activity conditions optimization using the response surface methodology and proteolytic extracts were characterized by zymography.

The concentration of TBT resistant isolates varied between 0.08% (in Setúbal harbor) and 7.67% (Peniche). From a total of 111 different isolates, 14 were able to produce extracellular enzymes - belonging to *Serratia*, *Citrobacter* and *Pseudomonas* genus. Most of proteolytic extracts exhibited simultaneously gelatinolytic and caseinolytic activity. At 30°C and pH 9, the lipolytic extracts, F3 and L2, exhibited activity of 8U/mL and 4 U / mL, respectively - alkaline lipases.

Our study shows that these TBT resistant isolates have the capacity to produce enzymes with a large biotechnological potential, with bacteria from Figueira da Foz and Leixões (F3 and L2) presenting the highest applicability to be used in detergent industry, due to their alkaline lipolytic produced molecules.

Key words: Extracellular enzyme, TBT resistant bacteria, Proteases, Lipases

Resumo

As enzimas são as mais notáveis e altamente especializadas proteínas, apresentando na maioria das vezes eficiência catalítica superior à de catalisadores sintéticos, sendo a sua produção industrial, assegurada, maioritariamente, por algumas espécies de microrganismos.

Os microrganismos provenientes de ambientes extremos desenvolvem mecanismos de adaptação, que lhes permite sobreviver em condições físico-químicas extremas, ou cenários contaminados. Podendo, portanto produzir enzimas ativos e/ou estáveis com elevado potencial biotecnológico e industrial.

Apesar da recente proibição da sua utilização em tintas anti incrustantes, o tributilestanho (TBT) é um contaminante comum em sistemas aquáticos, sendo considerado uma das substâncias mais tóxicas já introduzidas no ambiente marinho.

Neste sentido, microrganismos resistentes a TBT (capazes de crescer a 3mM de TBT) recolhidos de sete portos portugueses, foram isolados, caracterizados por rep-PCR e identificados por MALDI-TOF-MS. A atividade proteolítica e lipolítica extracelular destes isolados foram avaliadas. Os extratos lipolíticos foram submetidos a ensaios de otimização das condições de atividade pela metodologia de superfície de resposta e os extratos proteolíticos foram caracterizados por zimografia.

A percentagem de isolados resistentes a TBT variou entre 0.08% (porto de Setúbal) e 7.67% (porto de Peniche). Por rep-PCR distinguiu-se 111 isolados diferentes, dos quais 14 produziram enzimas extracelulares. A maior parte dos extratos proteolíticos apresentaram atividade caseínolítica e gelatinolítica. Dos extratos lipolíticos testados, F3 e L2 demonstraram ter atividade (8U/mL e 4 U/mL, respetivamente) a 30°C e a pH 9, sendo lipases alcalinas. Os isolados produtores de enzimas extracelulares foram identificados como pertencendo aos géneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Citrobacter*.

O nosso estudo comprovou que os isolados resistentes a TBT são capazes de produzir enzimas extracelulares com um grande potencial biotecnológico. As bactérias da Figueira e Leixões (F3 e L2) apresentaram atividade lipolítica alcalina, demonstrando potencial aplicação na indústria de detergentes.

Palavras-chave: Enzimas extracelulares, Bactérias resistentes a TBT, Proteases, Lipases

Índice de matérias

Abstract	ix
Resumo.....	xi
1. Introdução	1
1.1 Enzimas	1
1.1.1 Nomenclatura e Classificação	1
1.1.2 Microrganismos como fonte de enzimas.....	2
1.1.3 Enzimas extracelulares de microrganismos	4
1.2 Proteases.....	5
1.2.1 Fontes e produção de proteases.....	6
1.2.2 Aplicação biotecnológica e industrial	6
1.3 Lipases.....	7
1.3.1 Fontes e produção de lipases	9
1.3.2 Aplicação biotecnológica e industrial	9
1.4 Enzimas industriais	10
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Amostragem	15
3.2 Análise química de metais e compostos estanhados	15
3.3 Preparação da solução <i>stock</i> de tributilestanho (TBT) e do meio seletivo.....	16
3.4 Processamento laboratorial das amostras e isolamento dos microrganismos.....	16
3.5 Tipagem genética dos microrganismos	17
3.5.1 Extração de DNA genómico.....	17
3.5.2 Rep-PCR.....	17
3.5.3 Análise do perfil genético pelo método de Dice/UPGMA.....	18
3.6 Detecção de atividades enzimáticas extracelulares – <i>Screening</i> de microrganismos produtores de enzimas extracelulares em meio sólido	18

3.6.1	<i>Screening</i> de microrganismos produtores de proteases extracelulares.....	18
3.6.2	<i>Screening</i> de microrganismos produtores de lipase extracelular.....	19
3.7	Análise de proteases extracelulares por zimografia	20
3.8	Determinação da atividade lipolítica extracelular	20
3.8.1	Condições de fermentação.....	20
3.8.2	Curvas de crescimento	21
3.8.3	Atividade lipolítica.....	21
3.8.4	Metodologia das superfícies de resposta.....	22
3.9	Identificação dos isolados produtores de enzimas	23
3.9.1	“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry” (MALDI – TOF MS).....	23
3.10	Análises estatísticas.....	23
4.	Resultados	25
4.1	Características físico-químicas dos locais de amostragem.....	25
4.2	Análise química de metais e compostos estanhados presentes nas amostras de água	25
4.3	Porcentagem de resistentes isolados.....	25
4.4	Tipagem genética dos microrganismos por rep-PCR.....	26
4.5	Deteção de atividades enzimáticas extracelulares.....	33
4.6	Análise de proteases extracelulares por zimografia	34
4.7	Determinação da atividade lipolítica.....	35
4.7.1	Modelação e otimização das condições reacionais para os extratos lipolíticos	35
4.7.2	Influência da temperatura e do pH nas atividades dos extratos lipolíticos de cada isolado	35
4.8	Identificação dos microrganismos produtores de enzimas extracelulares.....	38
5.	Discussão e Conclusões	41
6.	Perspetivas futuras	49
7.	Referências bibliográficas.....	51
Anexo I.	57

Índice de figuras

Figura 1.1 – Reações catalisadas por lipases	8
Figura 4.1 - Gráficos referentes às ufc/mL e percentagens de resistentes, para cada local de amostragem, a concentrações crescentes de TBT (0.1, 1 e 3mM).	27
Figura 4.2 – Dendrograma da relação entre os padrões obtidos por rep-PCR, de todos os isolados, pelo método de coeficiente de Dice e UPGMA.	32
Figura 4.3 – Isolados produtores de enzimas extracelulares	33
Figura 4.4 – Zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina (0.1%), de extratos dos isolados produtores de proteases crescidos em meio TSB com 1.5% de NaCl.....	34
Figura 4.5 – Efeito do pH na atividade dos extratos lipolíticos dos isolados F3,L2 e V25	37
Figura 4.6 – Atividades lipolíticas dos diferentes isolados a pH 7.5 e a 30°C	38

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Classificação internacional das enzimas de acordo com a <i>Enzyme Committee</i>	2
Tabela 1.2 – Exemplos de tipos de extremófilos e as respectivas condições ambientais	3
Tabela 3.1 – Matriz Central Compósita Rotativa codificada e decodificada dos ensaios de atividade lipolítica para os diferentes isolados em estudo.....	22
Tabela 4.1 – Propriedades físico-químicas das águas amostradas para a recolha dos microrganismos	25
Tabela 4.2 – Microrganismos produtores de proteases e/ou lipases extracelulares	34
Tabela 4.3 - Atividade lipolítica (U/mL) dos isolados F3, A2, L2 e V25, após 30 min de reação, para cada ensaio da CCRD.....	36
Tabela 4.4- Influência da temperatura e o pH na atividade lipolítica (U/mL) de cada isolado.....	37
Tabela 4.5 – Identificação das espécies dos isolados produtores de enzimas extracelulares	39
Tabela I – Resultados das análises de metais nas amostras de água recolhidas.....	57

1. Introdução

1.1 Enzimas

A vida depende de uma série bem orquestrada de reações químicas catalisadas por catalisadores biológicos – **as enzimas**, sem os quais os processos que a tornam possível não se realizariam (Copeland, 2000). No interior das células, as enzimas atuam como biocatalisadores, envolvendo-se em diversas reações químicas e, conseqüentemente, na coordenação de diversas funções celulares, como por exemplo: a degradação de nutrientes; armazenamento e transformação em energia química; e síntese de macromoléculas a partir de precursores simples (Abedi et al., 2011; Nelson & Cox, 2005).

Todas as enzimas, com exceção das ribozimas, que são moléculas de RNA com capacidade catalítica, são proteínas formadas a partir dos 20 aminoácidos naturais existentes (Abedi et al., 2011). Dada a existência de diversas combinações possíveis entre esses aminoácidos, a natureza concebeu um leque de enzimas com estruturas moleculares, cinéticas de reação, especificidade para os substratos e funções biológicas, incrivelmente diversificadas. Tal facto permite a realização e regulação de todos os tipos de reações bioquímicas (Abedi et al., 2011).

Uma vez que as enzimas apresentam atividade catalítica fora dos sistemas vivos, com eficiência catalítica superior à de catalisadores químicos e inorgânicos, têm sido amplamente exploradas em biotecnologia. Isto porque demonstram elevada especificidade para com os seus substratos e aceleram consideravelmente as reações químicas (Beilen & Li, 2002; Nelson & Cox, 2005; Saraiva, 2009).

1.1.1 Nomenclatura e Classificação

As enzimas são classificadas com base nas reações que catalisam, através de um sistema de nomenclatura e classificação criado pela *Enzyme Committee* (EC), da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). Este sistema divide as enzimas em seis diferentes classes numeradas: (1) oxiredutases; (2) transferases; (3) hidrolases; (4) liases; (5) isomerases; e (6) ligases (tabela 1.1); cada uma delas dividida em subclasses, também numeradas. As enzimas que possuem estruturas diferentes mas que apresentam especificidade para o mesmo substrato também possuem o mesmo número de *Enzyme Committee* (EC) (Arnosti, 2011; Nelson & Cox, 2005).

Tabela 1.1 – Classificação internacional das enzimas de acordo com a *Enzyme Committee*. (adaptado de Nelson & Cox, 2005).

N.º	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxedorredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Reação de transferência de grupo funcionais
3	Hidrólases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Adição de grupos para formação de ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos no interior de moléculas produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à clivagem ATP

1.1.2 Microrganismos como fonte de enzimas

A biotecnologia tem oferecido, já há vários anos, através da exploração dos recursos naturais que se encontram ao nosso dispor, a oportunidade de se aproveitar tais recursos para a produção de bens diversos, de modo a atender às necessidades humanas. Do mesmo modo, os avanços na genética e na microbiologia tiveram um grande impacto nas tecnologias de produção de enzimas (Buchholz et al., 2005).

As enzimas podem ser isoladas e purificadas a partir de microrganismos, animais ou plantas. No entanto, são os microrganismos que representam a principal fonte destas enzimas pelas seguintes razões: elevada capacidade de produção de biomassa, dada pela facilidade de absorção dos nutrientes necessários para suportar taxas de metabolismo e biossíntese altas; enorme diversidade bioquímica; facilidade de adaptação a ambientes com característica muito distintas; facilidade de cultivo em laboratório; e facilidade de manipulação genética, permitindo modificar as estruturas e conseqüentemente as atividades, por forma a aumentar a produção do produto alvo (Demain, 2000).

Uma vez que 70% da superfície do planeta terra encontra-se coberta pelos oceanos, Zhang e Kim (2010) sugerem uma especial atenção a enzimas provenientes de microrganismos marinhos. Estes são capazes de colonizar o ambiente marinho, produzindo enzimas únicas, relativamente mais estáveis e mais ativas, quando comparadas às suas correspondentes em plantas ou animais. A singularidade dessas enzimas provém de propriedades específicas (salinidade e pressão elevadas, temperaturas baixas e condições

de iluminação irregulares) do meio em que se encontram. Uma outra mais-valia do uso de microrganismos para produção de enzimas reside na facilidade da sua recolha, cultivo e identificação (Debashish et al., 2005; Zhang & Kim, 2010).

Este potencial é ainda acrescido pela ocorrência de microrganismos marinhos em pequenos nichos, seja em simbioses com vários tipos de organismos marinhos como esponjas, corais, algas e outras espécies, ou mesmo pela sua ocorrência em habitats ou micro habitats distintos, tais como os ambientes extremos (extremófilos).

1.1.2.1 Microrganismos extremófilos

Os microrganismos extremófilos são microrganismos capazes de crescer e, acima de tudo, adaptarem-se a ambientes extremos, encontrando-se bem adaptados a condições extremas de temperatura, pH, concentração de sal e pressão (tabela 1.2) (Antranikian et al, 2005).

Tabela 1.2 – Exemplos de tipos de extremófilos e as respetivas condições ambientais (adaptado de Zhang & Kim, 2010).

Parâmetro ambiental	Tipo	Condições ambientais	Géneros
Temperatura	Psicrófilos	< 20°C	<i>Alteromonas, Bacillus, Psychrobacter, Methanococcus.</i>
	Termófilos	55 ~ 113 °C	<i>Thermococcus, Thermoproteus, Thermus, Thermotoga</i>
pH	Acidófilos	pH < 4	<i>Acidianus, Desulfurolobus, Sulfolobus, Thiobacillus</i>
	Alcalófilo	pH > 9	<i>Natronobacterium, Natronococcus, Bacillus</i>
Salinidade	Halófilos	2 ~ 5 M NaCl	<i>Haloarcula, Halobacterium, Haloferax, Halorubrum</i>

Dado que possuem características metabólicas peculiares, os microrganismos são capazes de colonizar diversos ambientes, podendo muitas vezes colonizar ambientes contaminados (Haller et al., 2011). Cruz e colaboradores (2007) descreveram, microrganismos capazes de se adaptarem e resistirem à presença de contaminantes, mais concretamente o tributilestanho (TBT). Os autores consideraram que, microrganismos capazes de crescer a concentrações de TBT entre os 0.05 mM e 3 mM, são microrganismos resistentes a TBT.

O TBT é um composto estanhado tendo sido amplamente utilizado, desde a década de sessenta, na preservação da madeira, como antifúngico em produtos têxteis, em sistemas de águas industriais, na indústria do papel e como anti-incrustante em tintas de barcos, sendo esta última a maior fonte de contaminação do meio marinho. É tóxico para diversos organismos aquáticos, incluindo bactérias, algas, zooplâncton e moluscos, afetando o crescimento, desenvolvimento, reprodução (imposexo – aparecimento de características fenotípicas masculinas em gastrópodes fêmea) e sobrevivência de muitas espécies marinhas (Lemos et al., 2011). Pelos motivos acima apresentados, em Outubro 2001, a *International Maritime Organization* (IMO) proibiu o seu uso em tintas de barcos. Não obstante a isso, elevadas concentrações de TBT são ainda encontradas no ambiente marinho (Suehiro et al., 2007)

Estudos revelam que, por se encontrarem adaptados a condições extremas, os microrganismos (grande parte de origem marinha) possuem uma estrutura fisiológica e um metabolismo único, podendo por isso produzir biocatalizadores com capacidades únicas (Zhang & Kim, 2010). A nível biotecnológico estes biocatalisadores são de grande importância. A possibilidade da sua utilização em processos industriais, que decorrem em condições adversas, poderá permitir uma melhor utilização da matéria-prima, minimizar a emissão de poluentes e reduzir o consumo energético, melhorando, simultaneamente, a qualidade e pureza dos produtos (Antranikian et al., 2005; Ferrer et al., 2007). Para além da perspectiva biotecnológica, o estudo de enzimas provenientes de ambientes extremos permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares, envolvidos nos processos de adaptação (Gohel & Singh, 2012).

Posto isto, tem-se que microrganismos capazes de resistir a stresses ambientais são potenciais produtores de enzimas com uma grande aplicabilidade biotecnológica.

1.1.3 Enzimas extracelulares de microrganismos

As enzimas de microrganismos podem ser classificadas como intracelulares e extracelulares. Segundo Priest (1977), enzimas extracelulares são enzimas sintetizadas e libertadas para o meio que envolve os microrganismos, encontrando-se completamente dissociadas das suas células. A secreção destes biocatalisadores ocorre sem que haja lise celular e envolve processos de permeabilidade altamente seletivos. Normalmente, tal acontece devido à impossibilidade de alguns nutrientes, necessários às células,

atravessarem a parede celular (Stinson & Merrick, 1974; Van Dedem & Moo-Young, 1973). Durante o crescimento microbiano, em meio de fermentação, o máximo de produção das enzimas é observado no final da fase exponencial ou na fase estacionária (Jaeger et al., 1994; Kuddus & Ramteke, 2012; Priest, 1977).

A produção de enzimas extracelulares pelos microrganismos é muito comum. A sua presença tem sido amplamente estudada em diversos microrganismos, como é o exemplo de fungos (Saraiva, 2009), leveduras (Chi et al., 2009; Ferrer et al., 2001) e bactérias (Daoud et al., 2013; Gupta et al., 2004).

Do ponto de vista industrial, a utilização de enzimas extracelulares é preferencial e conveniente, dado que ao serem excretadas para o meio de fermentação, o processo de recuperação e purificação destas enzimas (*downstream processing*) é mais simples e permite uma redução dos custos do processo industrial (Beilen & Li, 2002; R. Gupta et al., 2002).

Posto isto, a maioria dos estudos sobre enzimas debruça-se sobre hidrolases de origem marinha, sendo as proteases e as lipases duas das mais relevantes a nível comercial.

1.2 Proteases

As peptidases, comumente designadas proteases, são enzimas responsáveis pelo processo de proteólise, que consiste na quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos de proteínas e polipeptídeos. De acordo com a EC, as proteases pertencem à classe das hidrolases (Classe 3), que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (subclasse 4) (Zhu et al., 2011). Esta subclasse de enzimas divide-se em dois grupos: as exopeptidases, que quebram as ligações peptídicas próximas das extremidades da cadeia polipeptídica; e as endopeptidases, que quebram as ligações peptídicas a meio da cadeia polipeptídica (Abu Bakar et al., 2006; Zhu et al., 2011).

Normalmente, as proteases são classificadas, tendo em conta o mecanismo catalítico, em seis grupos: proteases de serina, proteases de treonina, proteases de cisteína, proteases aspárticas, metaloproteases e protease de ácido glutâmico (Chi et al., 2009). Zhu e colaboradores (2011) apresentam uma classificação alternativa, tendo em conta o pH ótimo a que operam: as acídicas, que apresentam uma gama de pH ótimo entre os 2 a 5 (maioria de fungos); as neutras, em que o pH ótimo ronda os 7 (maioria de plantas, alguns fungos e

bactérias); e as alcalinas, em que o pH ótimo encontra-se num intervalo de 8 a 11 (maioria dos géneros *Bacillus* e *Streptomyces*).

1.2.1 Fontes e produção de proteases

A produção de proteases é uma propriedade inerente a todos os microrganismos (Rao et al., 2006). Estas proteínas são conhecidas por estarem envolvidas em diversos processos fisiológicos fundamentais às células e tecidos, incluindo regulação da expressão genética, modificações covalentes de enzimas, nutrição proteica, esporulação e germinação, assim como em diversos processos patológicos (Tavano, 2013; Zani & Moreau, 2010).

Embora as proteases possam ser obtidas a partir de animais e plantas, os microrganismos representam a sua principal fonte, dada à sua diversidade bioquímica, à quantidade substancial de enzimas que produzem e à sua grande importância a nível científico e económico (Kasana et al., 2011; Rao et al., 2006). As enzimas proteolíticas microbianas podem ser intracelulares ou extracelulares, sendo a sua maioria extracelular. A produção de enzimas extracelulares é amplamente influenciada pela estirpe e, por fatores nutricionais e físico-químicos (temperatura, pH, fonte de azoto e carbono, sais inorgânicos, agitação e oxigénio dissolvido) (Kasana et al., 2011).

Em relação à questão de um meio ideal, para uma produção máxima de proteases extracelulares, Kasana e colaboradores (2011) realçam a inexistência de um meio com composição específica, uma vez que cada microrganismo ou estirpe possuiu necessidades e condições de crescimento únicas.

1.2.2 Aplicação biotecnológica e industrial

A classe das proteases representa um dos três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsável por cerca de 60% das vendas totais de enzimas, a nível mundial (Kuddus & Ramteke, 2012). Têm sido amplamente utilizadas a nível biotecnológico e industrial, principalmente nas indústrias alimentar, de detergentes, farmacêutica e do couro (Kuddus & Ramteke, 2012; Rao et al., 1998).

Na indústria alimentar, as proteases são utilizadas para modificar as características de proteínas alimentares, melhorando as suas propriedades funcionais, nutricionais e gustativas. Outra importante aplicação das proteases reside na sua utilização como aditivos em detergentes, de modo a substituir agentes surfatantes, sendo estes, muitas vezes, tóxicos

para o ambiente (Jegannathan & Nielsen, 2013; Zhu et al., 2011). A atividade e estabilidade destas enzimas a pH e temperaturas elevadas, e a compatibilidade com agentes quelantes e oxidantes, constituem pré-requisitos de extrema importância para a sua aplicação em detergentes (M. B. Rao et al., 1998). Uma protease com capacidade para operar a baixas temperaturas e pH, e na presença de detergentes, foi isolada de *Stenotrophomonas maltophilia* (bactéria psicrófila), apresentando elevada aplicabilidade na indústria dos detergentes (Kuddus & Ramteke, 2012).

Considerando a recente tendência para o desenvolvimento de tecnologias “amigas” do ambiente, de modo a reduzir problemas de poluição, as proteases têm tido inúmeras aplicações no tratamento de couro e em vários processos de biorremediação. Estas, também têm sido extensivamente utilizadas na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de diversos agentes terapêuticos (M. B. Rao et al., 1998).

1.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) catalisam, em meio aquoso, a hidrólise das ligações éster de tri-, di- e monoacilgliceróis, libertando ácidos gordos e glicerol. Para além das reações de hidrólise, estas enzimas, em condições termodinâmicas favoráveis (meio não aquoso), catalisam uma variedade de reações de síntese (esterificação e transesterificação) (Fig. 1.2) (Godoy et al., 2012).

As lipases são capazes de catalisar reações, com uma vasta gama de substratos. Tal facto encontra-se relacionado com a seletividade das lipases (seletividade para o substrato, regioseletividade e enantioseletividade). No entanto, as taxas dessas reações variam muito com a estrutura molecular dos substratos (Reis et al., 2009). Preferencialmente, as lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (TAG) de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono), distinguindo-se das esterases (EC 3.1.1.1) que catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia curta, hidrossolúveis (Godoy et al., 2012).

A atividade das lipases é fortemente influenciada pela existência de uma interface lípido-água, que permite a sua ativação (ativação interfacial) (Jaeger et al., 1994). Segundo Reis e colaboradores (2009), a ativação interfacial é uma característica única das lipases. Em meio aquoso, quando a concentração de substrato excede o limite de solubilidade, há um aumento significativo na atividade da lipase, uma vez que o substrato forma micelas ou

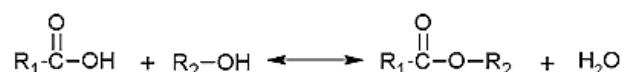
gotas de emulsão, criando assim uma maior área interfacial (Jaeger et al., 1994; Reis et al., 2009).

I. Hidrólise



II. Síntese

a) Esterificação



b) Transesterificação

Acidólise



Aminólise



Alcoólise



Interesterificação



Figura 1.1 – Reações catalisadas por lipases (adaptado de Godoy et al., 2012).

Na estrutura tridimensional de uma lipase verifica-se a existência de um elemento móvel que cobre o centro ativo da enzima - o *lid*, na ausência da interface hidrofóbica. Na presença da interface lípido-água, a estrutura sofre uma alteração na sua conformação, permitindo o acesso do substrato ao local ativo (Godoy et al., 2012).

1.3.1 Fontes e produção de lipases

As lipases são enzimas ubíquas na natureza e são produzidas por diversas plantas, animais e microrganismos. No entanto, as lipases microbianas representam a classe mais utilizada em aplicações biotecnológicas e industriais, devido à sua estabilidade, seletividade e grande especificidade para o substrato, sendo a maioria obtida de bactérias e fungos (Gupta et al., 2004). Os géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Serratia* destacam-se como fonte de lipases bacterianas, dada à facilidade de produção de biomassa (Treichel et al., 2009).

A maioria das lipases microbianas é extracelular e, conseqüentemente, a sua produção é fortemente influenciada pela composição do meio e fatores físico-químicos, como a temperatura, pH e oxigénio dissolvido. A presença de substratos lipídicos, como fonte de carbono, revela-se uma condição chave para a produção destas enzimas, uma vez que as lipases são enzimas induzíveis, ou seja, a sua produção resulta da resposta a um estímulo específico (Papagora et al., 2013; Treichel et al., 2009).

1.3.2 Aplicação biotecnológica e industrial

As lipases representam o terceiro maior grupo na produção de enzimas industriais, com um rendimento de cerca de mil milhões de dólares por ano (Amara et al., 2009). O facto de estas enzimas apresentarem estabilidade em solventes orgânicos, afinidade para com diversos substratos, elevada seletividade e catalisarem reações na presença de cofatores de baixo custo, torna-as num alvo importante para diversas indústrias (Godoy et al., 2012).

A versatilidade das lipases leva a que tenham uma grande aplicação nas indústrias alimentar, de detergentes, farmacêutica, de couro, têxtil, cosmética e de papel. A capacidade de síntese das lipases tem sido amplamente explorada para a produção de polímeros biodegradáveis e gorduras com elevado valor comercial, como é o caso da manteiga de cacau (Hasan et al., 2006).

Tal como as proteases, as lipases são também utilizadas em detergentes variados, para remoção de nódoas de gordura, reduzindo assim a utilização de químicos e os custos energéticos (lavagens a baixas temperaturas). Na indústria do papel e do couro, as lipases são utilizadas no tratamento da madeira e peles, respetivamente, para remoção de

compostos hidrofóbicos, facilitando processos seguintes. As lipases são ainda capazes de catalisar reações de transesterificação, permitindo assim, a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras animais (Zhu et al., 2011).

1.4 Enzimas industriais

É facto que, com o aumento da população mundial e o conseqüente aumento das suas necessidades, a humanidade cada vez mais depende da biotecnologia, de modo a atender as suas necessidades, melhorando a sua qualidade de vida e permitindo a sustentabilidade industrial e ambiental (Vaishnav & Demain, 2009). Neste contexto, as indústrias atuais têm recorrido a alternativas capazes de responder às necessidades crescentes das populações e, ao mesmo tempo, diminuir a utilização de recursos não renováveis e o impacto sobre o meio ambiente. Assim, diversos materiais de origem natural têm sido utilizados para substituir ou complementar as tecnologias convencionais, como é o caso das enzimas (Jegannathan & Nielsen, 2013).

Tal como já foi referido anteriormente, as enzimas são ubíquas a todos os sistemas vivos, sendo responsáveis por catalisar as reações químicas, que permitem a sua sobrevivência e reprodução, de forma rápida, seletiva e eficiente (Vaishnav & Demain, 2009). O facto de as enzimas conservarem as suas características fora dos sistemas vivos, tem vindo a permitir a sua utilização como biocatalisadores em diversos processos industriais e ambientais (Abedi et al., 2011).

A utilização de enzimas como biocatalisadores em processos industriais e ambientais requer estudos prévios de modelação e otimização das condições físico-químicas que influenciam de forma direta a sua atividade e/ou produção. Este é um importante passo para que se possa compreender, como é que esses parâmetros influenciam a produção de enzimas.

A metodologia de superfície resposta (*Response Surface Methodology*, RSM) é uma ferramenta estatística muito útil para modelação e análise de problemas cujas respostas são influenciadas por várias variáveis, com o objetivo de principal de otimizar as respostas (Montgomery, 2007). Os diversos fatores implicados são variados simultaneamente permitindo a realização de um número limitado de testes experimentais, representando uma abordagem analítica mais rápida e mais económica do que o tradicional em que, os estudos

de otimização são realizados variando uma variável de cada vez, mantendo os outros constante (Macedo et al., 2004; Papagora et al., 2013).

A RSM tem sido amplamente utilizada na modelação e otimização de diversos processos biotecnológicos, como por exemplo, na otimização das condições de atividade de enzimas (ex.: lipases), relacionando diversos fatores físico-químicos (temperatura, pH, fonte de carbono e azoto, entre outros) (Hasan-Beikdashti et al., 2012; Papagora et al., 2013). Uma das matrizes mais utilizadas em RSM é a matriz central compósita rotativa (*Central Composite Rotatable Design*, CCRD), que permite relacionar as diferentes variáveis para otimização da resposta através de desenhos experimentais.

A CCRD consiste em três conjuntos de ensaios experimentais: 1) uma matriz fatorial das variáveis em estudo, cada uma com dois níveis (mínimo, -1 e máximo, 1); 2) um conjunto de pontos estrela, representados por α e $-\alpha$ (sendo $\alpha=\sqrt{2}$) que resultam das medianas dos pontos fatoriais e permitem testar a precisão do modelo; 3) várias repetições do ponto central, que se consideram constantes ao longo dos ensaios experimentais (representados na tabela 3.1 da seção Materiais e Métodos) (Montgomery, 2007).

A nível industrial, a maioria das enzimas utilizadas são obtidas por aplicação de técnicas de manipulação molecular (tecnologia de DNA recombinante e engenharia de proteínas), permitindo a obtenção de enzimas com propriedades necessárias para processos industriais específicos e em quantidades consideráveis (Abedi et al., 2011; Vaishnav & Demain, 2009).

Os avanços na genética e na microbiologia tiveram um grande impacto nas tecnologias de produção de enzimas, como referido anteriormente. Por isso, é de extrema importância prática que os microrganismos produtores de enzimas sejam identificados. As técnicas de identificação genómicas, baseadas em reações de PCR têm-se demonstrado uma boa alternativa na identificação de uma variedade de microrganismos, revelando-se ser robustas e discriminatórias, permitindo reduzir a necessidade de um longo período de cultura e processos de identificação morfológica extensos (Alves et al., 2007).

O Rep-PCR é uma técnica de tipagem genética muito utilizada na caracterização e identificação de espécies bacterianas. Este método baseia-se na amplificação, via PCR, de sequências palindrómicas repetitivas (*Rep*), presentes em genomas bacterianos, utilizando *primers* específicos. A amplificação gera uma série de fragmentos de DNA que, quando

separados em géis de agarose, formam um padrão de bandas muito específico para cada microrganismo (Adiguzel et al., 2009; Alves et al., 2007). É um método extremamente fiável, reprodutível, rápido e altamente discriminativo, pelo que permite a identificação de microrganismos a nível das espécies e estirpes (Adiguzel et al., 2009; Healy et al., 2005).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo de enzimas extracelulares de microrganismos marinhos resistentes a TBT recolhidos nos maiores portos marítimos portugueses.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Estudar e isolar microrganismos resistentes a TBT existentes em portos marítimos distintos em Portugal;
- Detetar atividades de lipases e proteases extracelulares em microrganismos resistentes a elevadas concentrações de TBT;
- Caracterizar as proteases e otimizar a atividade de extratos lipolíticos extracelulares, variando as condições de temperatura e pH, pela metodologia de superfície de resposta;
- Identificar os microrganismos, resistentes a elevadas concentrações de TBT, produtores de enzimas extracelulares.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostragem

As amostras de água foram recolhidas em sete locais portuários ao longo da costa portuguesa: Póvoa de Varzim (**V**; 41.376120,-8.766945), Leixões (**L**; 41.195238,-8.684177), Aveiro (**A**; 40.645899,-8.727098), Figueira da Foz (**F**; 40.146848,-8.849176), Peniche (**P**; 39.355422,-9.375479), Setúbal (**St**; 38.521228,-8.887277) e Sines (**S**; 37.950219,-8.864599).

Nos diferentes portos a recolha de um total de 2L de água foi feita na maré baixa, em profundidade e junto ao sedimento, utilizando uma garrafa tipo Van-Dorn, sendo que 1L foi utilizado para análises químicas e o restante para a recolha dos microrganismos. *In situ*, com recurso a uma sonda multi-paramétrica (Hanna instruments Inc, HI9828, Itália), foram registados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura (°C); salinidade (‰); oxigénio dissolvido (%); pH; condutividade (WS.cm⁻¹); e profundidade (m).

As amostras recolhidas foram transportadas para o laboratório numa arca refrigerada, e processadas em menos de 8 horas.

3.2 Análise química de metais e compostos estanhados

A análise de diversos metais foi realizada no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal): prata (Ag), cádmio (Cd), cobalto (Co), crómio (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb), estrôncio (Sr), zinco (Zn), estanho (Sn) e mercúrio (Hg). As amostras de água foram acidificadas e posteriormente analisadas por espectrofotometria de ICP- MS. As amostras foram ionizadas por ICP e posteriormente identificadas por MS.

As análises químicas a monobutilestanho, dibutilestanho e tributilestanho (MBT, DBT e TBT) das amostras portuárias foram realizadas, pelo Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico (Lisboa, Portugal), utilizando o método espectrométrico GC-MS.

3.3 Preparação da solução *stock* de tributilestanho (TBT) e do meio seletivo

Na preparação da solução *stock* de tributilestanho (1.23M) (TBT, 96% pureza; Sigma-Aldrich, Espanha), este foi dissolvido em etanol absoluto (Panreac Quimica, Espanha), sendo posteriormente armazenado num local escuro e à temperatura ambiente.

O meio seletivo utilizado para o crescimento microbiano foi o *Tryptic Soy Agar* (TSA, Sharlau, Espanha), suplementado com 1.5% (m/v) de NaCl (Panreac, Espanha) e TBT a concentrações crescentes (0.1, 1 e 3 mM), sendo as concentrações de TBT ajustadas para totalizar 1% de solvente no meio. Foram preparados meios para o controlo suplementado com 1% de etanol.

3.4 Processamento laboratorial das amostras e isolamento dos microrganismos

Em laboratório as amostras de água foram filtradas a vácuo sendo os microrganismos concentrados à superfície de filtros de porosidade igual a 0.45 µm e diâmetro 47 mm (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). Posteriormente os filtros foram colocados em placas de Petri contendo o meio seletivo e incubados a 30°C entre 24 a 96 horas, dependendo da capacidade de crescimento dos microrganismos. Para cada concentração de TBT foram feitas filtrações de diferentes volumes de amostra de cada local e em triplicados, de modo a que no final se obtivessem números contáveis de unidades formadoras de colónias (UFC entre 9-90). Passado o tempo de incubação, as UFC, à concentração máxima de TBT (3 mM), foram escolhidas de forma aleatória para cada local de amostragem, tendo em conta diferentes características fenotípicas diferentes. Os microrganismos foram isolados por riscados sucessivos, obtendo no final culturas puras.

Os microrganismos isolados foram mantidos em placa e também criopreservados em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB, Sharlau, Espanha) com 20% (v/v) de glicerol a -80°C.

Os isolados foram enumerados de acordo com o local de amostragem, sendo designados pela inicial de cada local (exemplo: P1, para Peniche e V2, para Póvoa de Varzim).

3.5 Tipagem genética dos microrganismos

A tipagem genética dos isolados obtidos na presença de 3mM de TBT foi realizada por análise das sequências rep (*Repetitive Element Polindromyc*) com uma etapa prévia de extração do DNA genómico, segundo o que se descreve de seguida.

3.5.1 Extração de DNA genómico

Numa primeira etapa, prepararam-se culturas frescas de cada isolado por inoculação de uma colónia em 500 µL de TSB com 1.5% de NaCl e estas foram incubadas num agitador orbital, *overnight* a 30°C (200 rpm). Após o período de incubação, transferiu-se 250 µL de cultura para um microtubo estéril e de seguida centrifugou-se a 15680 × g por 5 minutos, de modo a recolher as células. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Adicionou-se 5 µL de lisozima (10 mg/mL de água estéril) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de solução de lise (*Genomic DNA purification kit*, Fermentas, Alemanha) e voltou-se a incubar a 65°C por 10 min. Juntou-se 100 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e posteriormente centrifugou-se a 15680 × g por mais 5 min. À fase aquosa adicionou-se 100 µL de isopropanol, tendo sido esta previamente transferida para um novo microtubo, e homogeneizou-se a mistura. Centrifugou-se a 15680 × g por 10 min e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 100 µL de etanol a 70% e voltou-se a centrifugar por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 40-50 µL de tampão TE 1x e por eletroforese em gel de agarose a 0.8% avaliou-se a qualidade das amostras de DNA de cada isolado. As amostras foram conservadas a -20°C.

3.5.2 Rep-PCR

O rep-PCR é um método de tipagem que consiste na amplificação via PCR de elementos repetitivos, presentes em genomas bacterianos, utilizando *primers* específicos (Adiguzel et al., 2009; Alves et al., 2007).

Na reação de PCR foram utilizados dois *primers*, REP 1R (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP 2 (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') (Stab Vida, Portugal), para uma mistura reacional final de 25 µL. Previamente preparou-se, em condições de esterilidade, uma mistura com um volume de 24 µL contendo: 11.15 µL de água ultrapura, 5 µL de tampão a

5x (Promega, EUA), 3 μ L de $MgCl_2$ (25mM; Promega, EUA), 1.5 da solução de dNTP (2mM; Bioline, GB), 1.25 μ L de DMSO (99.5 %, Sigma-Aldrich, EUA), 1 μ L de cada *primer* (10mM) e 0.1 μ L de *taq* DNA polimerase (Promega, EUA). À mistura adicionou-se 1 μ L de DNA extraído de cada isolado e à reação de controlo negativo 1 μ L de água ultrapura. As reações de amplificação por PCR foram realizadas num termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA) segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, emparelhamento a 40°C por 1 min, uma etapa de extensão a 65°C por 8 min (30 ciclos) e uma extensão final a 65°C por 16 min. Após o processo as amostras foram armazenadas a -20°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1.5% m/v), a 80v durante 150 min. Os géis foram corados com uma solução de brometo de etídio e digitalizados (Gel-Doc; Bio-Rad,EUA).

3.5.3 Análise do perfil genético pelo método de Dice/UPGMA

A análise dos padrões obtidos por rep-PCR realizou-se com recurso ao *software* Gelcompar II (versão 3.0; Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using Arithmetic”). A relação entre os perfis de cada isolado foi demonstrada por um dendrograma e através do coeficiente de Dice obteve-se a similaridade entre os mesmos (Ateba & Mbewe, 2013). Os perfis de isolados com valores de similaridade igual ou superior a 94% foram considerados como sendo os mesmos.

3.6 Detecção de atividades enzimáticas extracelulares – *Screening* de microrganismos produtores de enzimas extracelulares em meio sólido

Após a obtenção dos diferentes isolados, procedeu-se à deteção das atividades proteolíticas e lipolíticas de cada microrganismo. Para tal, meios diferenciais contendo os substratos para as enzimas em estudo foram preparados, permitindo assim, uma avaliação qualitativa da atividade enzimática.

3.6.1 *Screening* de microrganismos produtores de proteases extracelulares

Para a deteção da atividade proteolítica preparou-se meio TSA suplementado com 1% (v/v) de *skim milk* (Molico, Nestlé, Portugal) (adaptado de Kasana et al., 2011). Primeiramente preparou-se uma solução de *skim milk* a 10%, tendo sido esterilizada a 121°C por 15 min. Após os 15 min, retirou-se a solução da autoclave de modo a promover

um rápido arrefecimento e evitar que a lactose, contida no *skim milk*, caramelizasse, alterando as propriedades do mesmo. Por fim, foi adicionado ao TSA a uma temperatura de 50°C, homogeneizou-se suavemente e distribuiu-se em placas de Petri com 90mm de diâmetro.

Inoculou-se uma colónia de cada isolado e as placas foram incubadas a 30°C entre 24 a 96 horas. Após o crescimento, a produção de proteases extracelulares foi feita por observação direta das placas. A existência de halos transparentes à volta das colónias indicou a degradação do substrato existente no meio de cultivo (Kasana et al., 2011).

3.6.2 Screening de microrganismos produtores de lipase extracelular

A produção de lipases extracelulares foi detetada pelo crescimento dos microrganismos em meio sólido suplementado com azeite e rodamina B, um corante que juntamente com os ácidos gordos, libertados pela hidrólise de triacilgliceróis, forma um complexo fluorescente quando exposto à luz ultravioleta (adaptado de Kouker & Jaeger, 1987).

A preparação do meio sólido de crescimento dividiu-se em três etapas principais:

- i. Preparação da emulsão lipoidal, constituída por 30 mL de azeite virgem extra (9º sentido, Portugal) e 250 µL de emulsionante *tween* 80 (Scharlau, Espanha), em 50 mL água destilada;
- ii. Preparação do meio base, constituído por 4.5 g de caldo nutritivo (Merck, Alemanha), 1.25 g de extrato de levedura (Merck, Alemanha) e 10 g de agar (Merck, Alemanha), dissolvidos em 450 mL de água destilada.
- iii. Preparação da solução de rodamina B (Sigma-Aldrich, EUA), dissolvendo-se 50 mg de rodamina B em 50 ml de água destilada estéril.

A emulsão lipoidal e o meio base foram preparados e esterilizados na autoclave separadamente, a 121°C por 15 min. A solução de rodamina B foi preparada à parte das restantes e foi esterilizada por filtração. À emulsão lipoidal juntou-se, de forma asséptica, 20 mL da solução de rodamina B e misturou-se. Dessa mistura, 50 mL foram adicionadas ao meio base. Por fim, a mistura final foi distribuída em placas de Petri de 90mm de diâmetro e seguidamente procedeu-se à inoculação dos microrganismos. As placas foram incubadas a 30°C entre 48 a 96 horas e a observação da produção de lipases foi feita sob

luz ultravioleta a 350 nm, pelo que presença dessas enzimas deu-se pela formação de halos com fluorescência laranja em redor das colónias.

Os isolados com maior potencial na produção de lipases extracelulares foram então escolhidos para ensaios posteriores.

3.7 Análise de proteases extracelulares por zimografia

A zimografia é uma técnica de eletroforese que implica a co-polimerização de um substrato em gel de poliacrilamida, de modo a detetar a atividade de enzimas (Wilkesman & Kurz, 2009). Neste trabalho foram utilizadas como amostras os extratos, livres de células, resultantes do crescimento dos microrganismos em meio TSB com 1.5% de NaCl.

Os géis de poliacrilamida, contendo como substrato 0.1% (m/v) a gelatina, e o procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Saraiva (2009). Após polimerização dos géis, 30 μ L de cada amostra foi aplicada no gel e a eletroforese foi realizada a voltagem constante (100 V durante 90 min), em ambiente refrigerado.

3.8 Determinação da atividade lipolítica extracelular

3.8.1 Condições de fermentação

A produção de lipases foi realizada por inoculação das bactérias num meio mineral basal, contendo na sua composição (g/L): 1 g de extrato de levedura (Merck, Alemanha), 2 g de NaCl (Panreac, Espanha), 0.6 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Alemanha), 0.5 g de $(NH_4)_2SO_4$ (Merck, Alemanha), 0.3 g de KH_2PO_4 (Panreac, Espanha), 0.3 g de K_2HPO_4 (Merck, Alemanha), 0.01% (m/v) de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck, Alemanha), 1% (v/v) de azeite virgem extra (9º sentido, Portugal) e 20% (v/v de azeite) de *tween* 80 (Scharlau, Espanha) (adaptado de Joseph et al., 2012; Papagora et al., 2013).

Para a realização dos crescimentos, uma colónia de cada isolado foi inoculada em tubos de ensaio com meio TSB (10ml) com 1.5% NaCl e de seguida incubadas num agitador orbital a 30°C (130 rpm), até atingirem uma densidade ótica (DO) de 0.6 ± 0.1 (600 nm). Em *erlenmeyers* de 500 mL, 1.5 ml de inóculo (1% v/v) foi adicionado a 150 mL de meio mineral basal. As culturas foram incubadas a 30° (150 rpm).

3.8.2 Curvas de crescimento

Para os isolados com maior potencial na produção de lipases extracelulares foram realizadas curvas de crescimento, de modo a definir o tempo que demoram a atingir a fase estacionária, nas condições de crescimento anteriormente descritas (subseção 3.9.1). Isto porque, é na fase estacionária que se regista a produção máxima de enzimas (Stinson & Merrick, 1974) Os crescimentos dos microrganismos com maior potencial na produção de lipases extracelulares foram feitos em duplicado, mais um controlo negativo que não foi inoculado.

3.8.3 Atividade lipolítica

Pelas curvas de crescimento o tempo de incubação foi definido para 35h (dados não apresentados). Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a $12850 \times g$ por 15 min, o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi recolhido e congelado a -80°C em alíquotas de 500 μL , para posterior avaliação da atividade lipolítica.

A determinação da atividade lipolítica extracelular de cada isolado foi realizada por um método espectrofotométrico que estima a quantidade de *p*-nitrofenol (*p*-NP) libertado durante a hidrólise do substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP), adaptado do método de Winkler e Stuckmann (1979). Em 10 mL de isopropanol dissolveram-se 30 mg de *p*-NPP (Sigma-Aldrich, EUA) e juntou-se 90 mL de um tampão a pH determinado para o estudo. Transferiu-se 2.4 ml da solução de *p*-NPP para um tubo de ensaio e adicionou-se 100 μL de extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada por 30 min, variando a temperatura e o pH em causa, para testar a atividade enzimática. Após o período de incubação as reações foram interrompidas por adição de 100 μL CaCl_2 (500 mM) (adaptado de Gupta et al., 2002). De seguida, as amostras foram centrifugadas a $16168 \times g$ por 5 min para clarificar a solução, sendo a absorvância do sobrenadante medida a 405 nm (Hasan-Beikdashti et al., 2012; Joseph et al., 2012).

A atividade lipolítica foi calculada através da elaboração de curvas de calibração de *p*-NP com concentrações variáveis entre os 0.5 – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a diferentes valores de pH uma vez que o *p*-NP apresenta diferentes coeficientes de absorção molar a diferentes valores de pH. Nas reações a pH ácido, no final da reação, adicionou-se de 100 μl de NaOH a 500 mM, de modo a aumentar o pH da reação e proceder-se à leitura da atividade.

Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 nmol de *p*-NP min⁻¹mL⁻¹ (Winkler & Stuckmann, 1979).

3.8.4 Metodologia das superfícies de resposta

Os extratos enzimáticos dos microrganismos que apresentaram maior potencial na produção de lipases extracelulares foram escolhidos para esta etapa do trabalho. Através da RSM as condições de atividade em que enzimas operam (temperatura e pH) foram otimizadas.

Foram realizados ensaios distintos de modo a poder otimizar -se as condições de atividade, tendo em conta as duas variáveis em estudo: a temperatura e o pH. Para tal elaborou-se uma matriz central compósita rotativa (CCRD) de dois fatores (2^k , em que $k=2$) com os respetivos testes de modelação e otimização da atividade lipolítica (Tabela 3.1). De acordo com a CCRD formulada, fez-se variar a temperatura entre os 8.9°C e 51.2°C, e o pH entre 4.7 e 10.5, e a atividade determinada pelo ensaio de *p*-NPP.

Tabela 3.1 – Matriz Central Compósita Rotativa codificada e decodificada dos ensaios de atividade lipolítica para os diferentes isolados em estudo.

Ensaio	Matriz Codificada		Matriz Descodificada		
	T (°C)	pH	T (°C)	pH	
1	-1	-1	15	5.5	Matriz fatorial 2K
2	1	-1	45	5.5	
3	-1	1	15	9.5	
4	1	1	45	9.5	
5	- α	0	8.9	7.5	Pontos estrela $\alpha=\sqrt{2}$
6	α	0	51.2	7.5	
7	0	- α	30	4.7	
8	0	α	30	10.5	
9	0	0	30	7.5	Repetições do ponto central
10	0	0	30	7.5	
11	0	0	30	7.5	
12	0	0	30	7.5	

3.9 Identificação dos isolados produtores de enzimas

3.9.1 “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry” (MALDI – TOF MS)

Todos os isolados produtores de enzimas extracelulares foram submetidos a identificação por MALDI-TOF MS, pelo Serviço de Microbiología, Hospital S. Pedro de Alcántara em Cáceres (Espanha). Esta técnica baseia-se na ionização das amostras (cultura de microrganismos), previamente dissolvidas numa solução de matriz (geralmente um ácido orgânico), expostas a pulsos de laser. As amostras vaporizadas e há ionização das proteínas. Cria-se um campo eletromagnético, os iões são acelerados e entram num túnel de voo. O tempo que os analitos demoram a chegar ao detetor (*time of flight* - TOF) é medido com precisão, sendo este definido pelo grau de ionização e pela massa das proteínas. No final gera-se um espectro característico, específico e único para cada espécie. Com recurso a um *software*, os espectros são comparados com um banco de dados de referências, baseando-se em similaridades. Um valor de similaridade acima de 2.0 indica uma identificação a nível de espécie e um valor compreendido entre 2.0 e 1.7 indica uma identificação fiável a nível do género (Wieser et al., 2012).

3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram feitas com recurso ao *software* GraphPad Prism 6 para Windows. Para tal fez-se a análise de variância com um fator (*One-way ANOVA*), seguido pelo teste de Tukey para demonstrar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e pelo teste de Dunnet de modo a comparar os tratamentos com o controlo. O nível de significância foi definido pelo $P \leq 0.05$.

4. Resultados

4.1 Características físico-químicas dos locais de amostragem

Na tabela 4.1 encontram-se descritos os parâmetros físico-químicos registados nos diferentes locais de amostragem.

Tabela 4.1 – Propriedades físico-químicas das águas amostradas para a recolha dos microrganismos – na Póvoa de Varzim, Leixões, Aveiro, Figueira da Foz, Peniche, Setúbal e Sines.

Parâmetros	Póvoa de Varzim	Leixões	Aveiro	Figueira da Foz	Peniche	Setúbal	Sines
Temperatura (°C)	13.6	14.1	11.5	13.5	17.8	15.8	16.1
pH	8.7	8.9	8.1	8.3	7.8	8.8	9.0
Salinidade (‰)	34.5	34.2	37.4	37.3	31.8	27.9	34.8
Condutividade (WS.cm ⁻¹)	46.3	47.3	52.9	46.2	43.8	39	47.3
OD (%)	92.5	48.0	82.0	76.0	69.3	99.9	99.0
Profundidade (m)	3.0	8.0	7.5	5.0	6.5	3.5	4.0

4.2 Análise química de metais e compostos estanhados presentes nas amostras de água

Nas amostras de água recolhidas foram detetadas baixas concentrações de pelo menos um metal (Anexo I).

A concentração de compostos estanhados (MBT, DBT e TBT), em todas as amostras de água, foi inferior a 50 ng/L.

4.3 Percentagem de resistentes isolados

O crescimento dos microrganismos foi realizado em meios com concentrações crescentes de TBT (0.1, 1 e 3 mM), com o objetivo principal de isolar microrganismos resistentes à concentração máxima de TBT testada.

Pela figura 4.1, é possível observar o crescimento dos microrganismos nas diferentes concentrações de teste. No entanto, à medida que a concentração de TBT aumenta, verifica-se uma diminuição no número de unidades formadoras de colónias por mililitro

(UFC.mL⁻¹), e consequente diminuição da percentagem de microrganismos resistentes, em relação ao controlo.

Relativamente à concentração de 0.1 mM, Póvoa de Varzim foi o local onde se obteve maior percentagem de resistentes (45.46%), e o que apresentou menor percentagem foi Setúbal (2.56%). À concentração de 1 mM, verificou-se uma diminuição abrupta da percentagem de resistentes para a maioria dos locais, com exceção de Peniche que registou a maior percentagem (8.28%). A menor percentagem foi registada para Aveiro com 0.26% de microrganismos resistentes. Para a concentração máxima de TBT (3mM), a maior percentagem de resistentes foi outra vez registada para Peniche (7.67%) e Setúbal foi o local com menor percentagem de resistentes (0.08 %).

À concentração máxima foi isolado um total de 157 microrganismos, sendo estes, os mais resistentes, utilizados para a realização de ensaios posteriores.

4.4 Tipagem genética dos microrganismos por rep-PCR

A tipagem dos microrganismos foi realizada por análise de padrões obtidos por rep-PCR, permitindo verificar a variabilidade de microrganismos presentes nas amostras de cada local, permitindo que apenas microrganismos diferentes fossem utilizados nas etapas seguintes.

A similaridade genética entre os diferentes microrganismos é dada pelo dendrograma da figura 4.2. É possível observar que alguns microrganismos possuem perfis genéticos muito similares, sendo que perfis com similaridade igual ou superior a 94% foram considerados como sendo os mesmos. Portanto, os isolados que se encontram agrupados à direita da linha vermelha pertencem à mesma espécie.

Tendo em conta a variabilidade de microrganismos, presentes nas amostras de cada local de amostragem, Póvoa de Varzim foi o local que apresentou maior variabilidade, com vinte e um microrganismos diferentes, e Peniche foi o local com menor variabilidade microbiana, com apenas cinco microrganismos diferentes.

Dos 157 microrganismos resistentes a TBT, 111 foram considerados diferentes entre si.

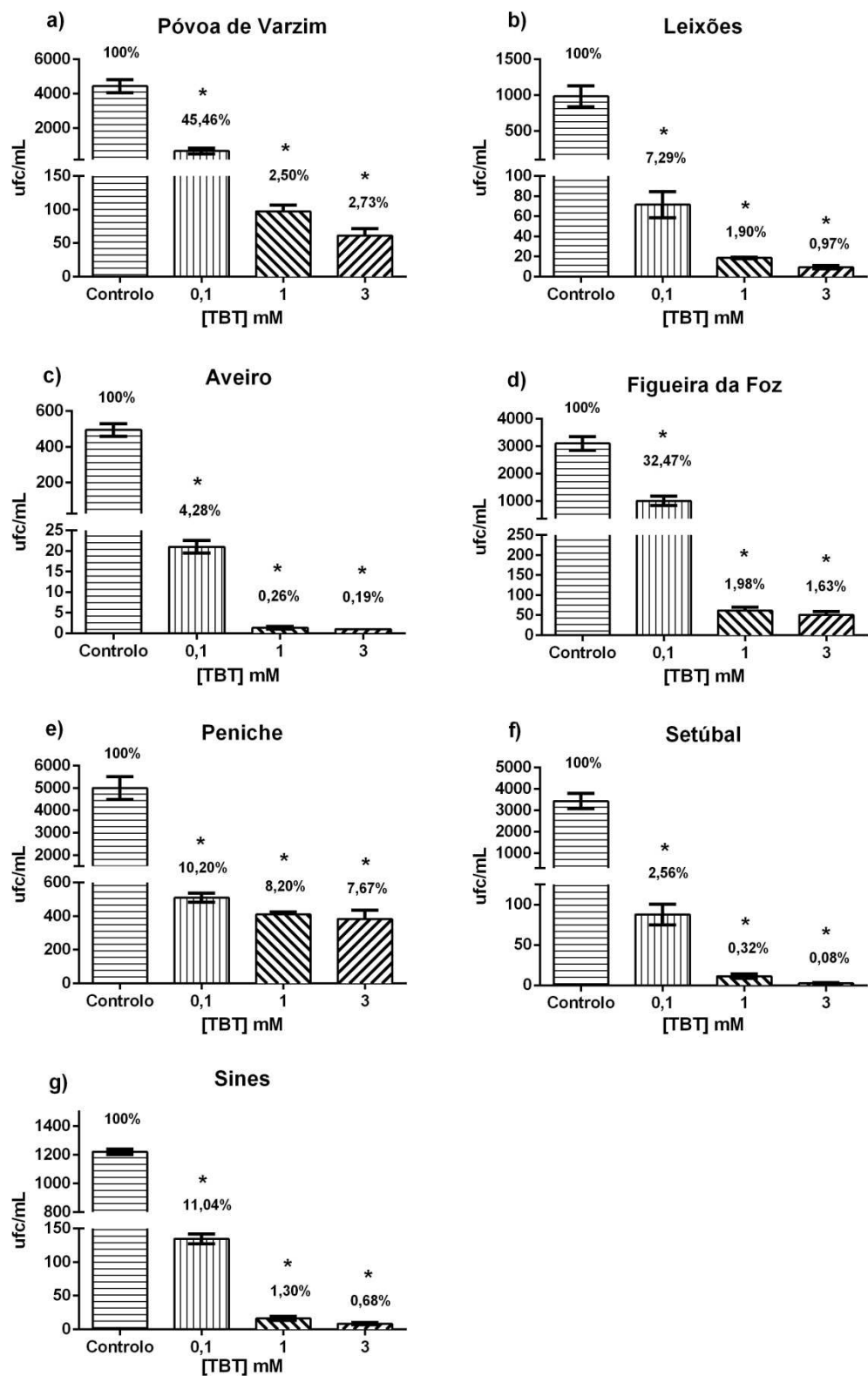
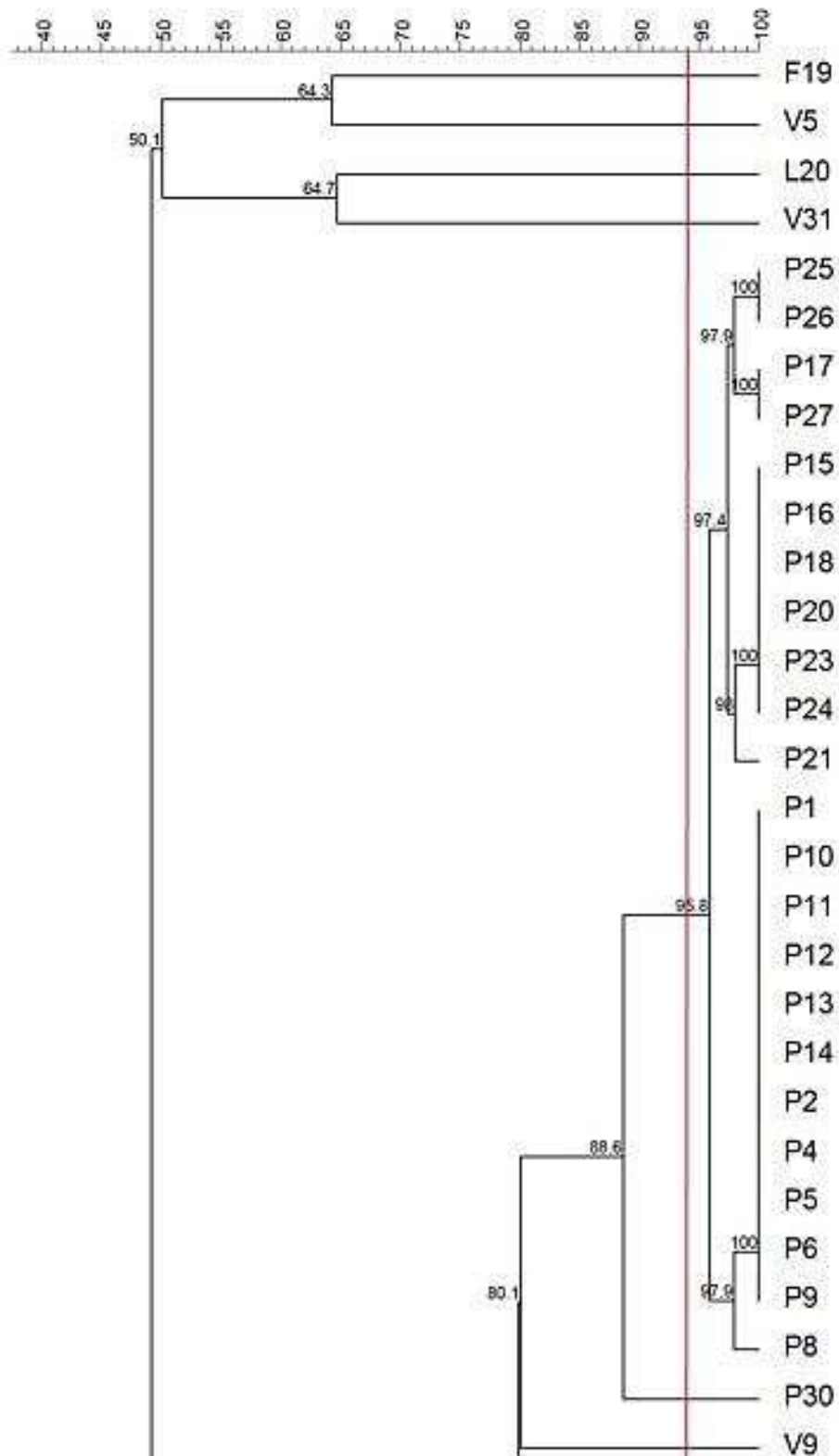
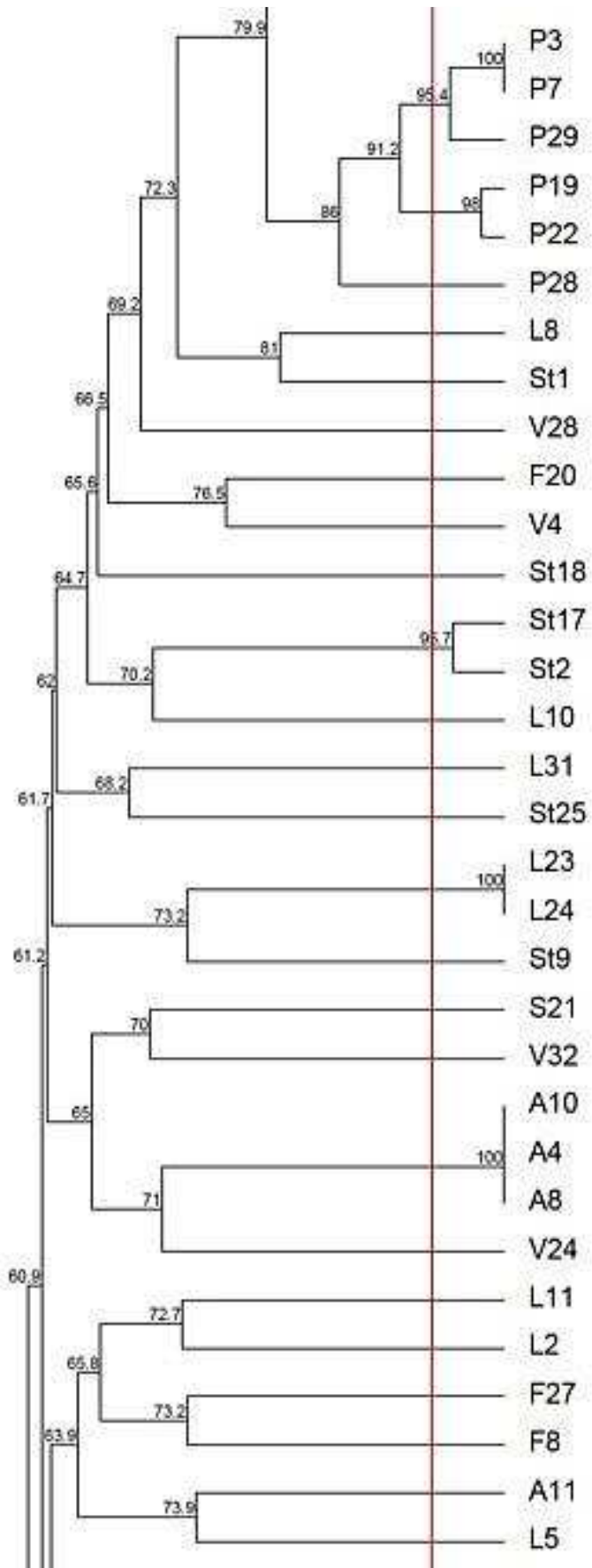
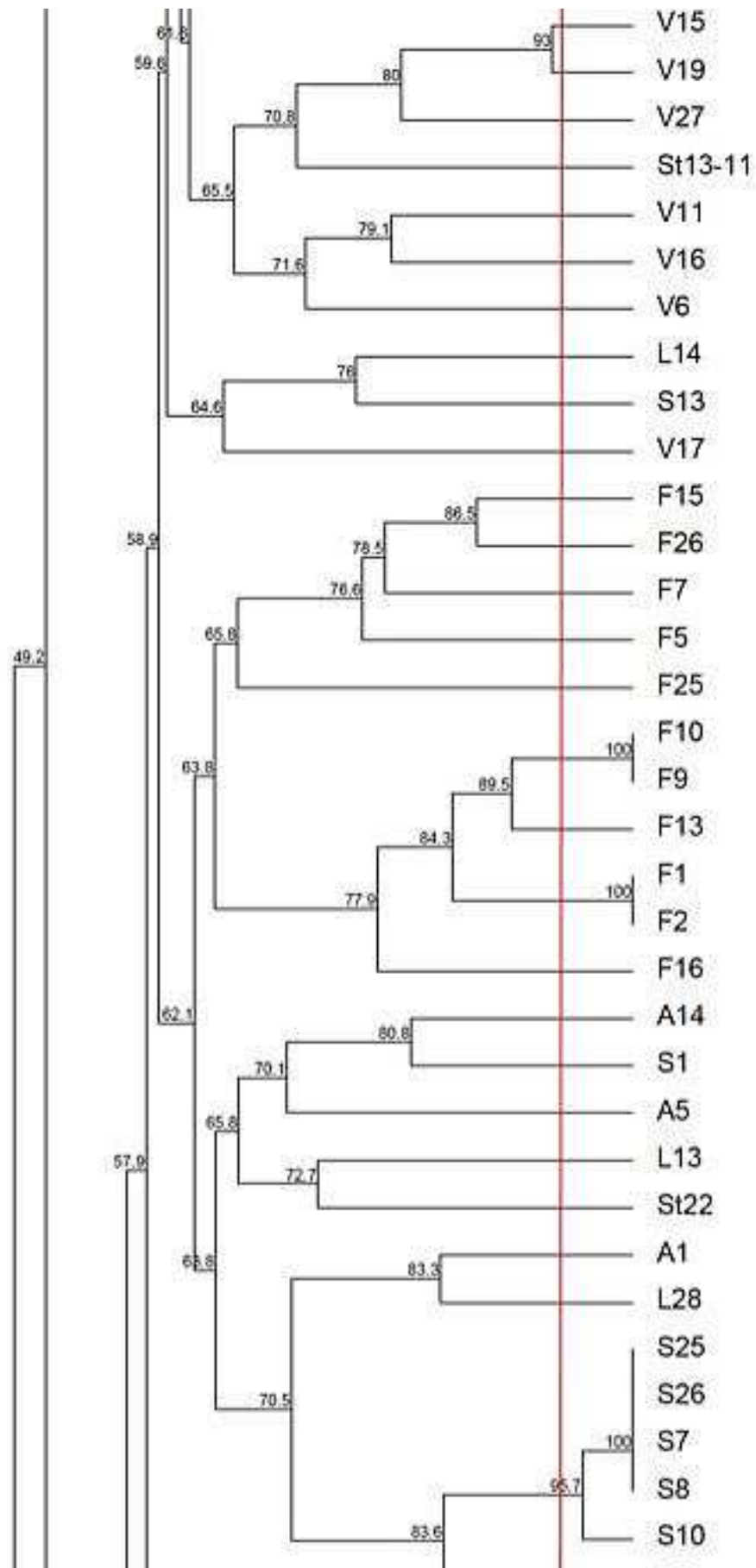


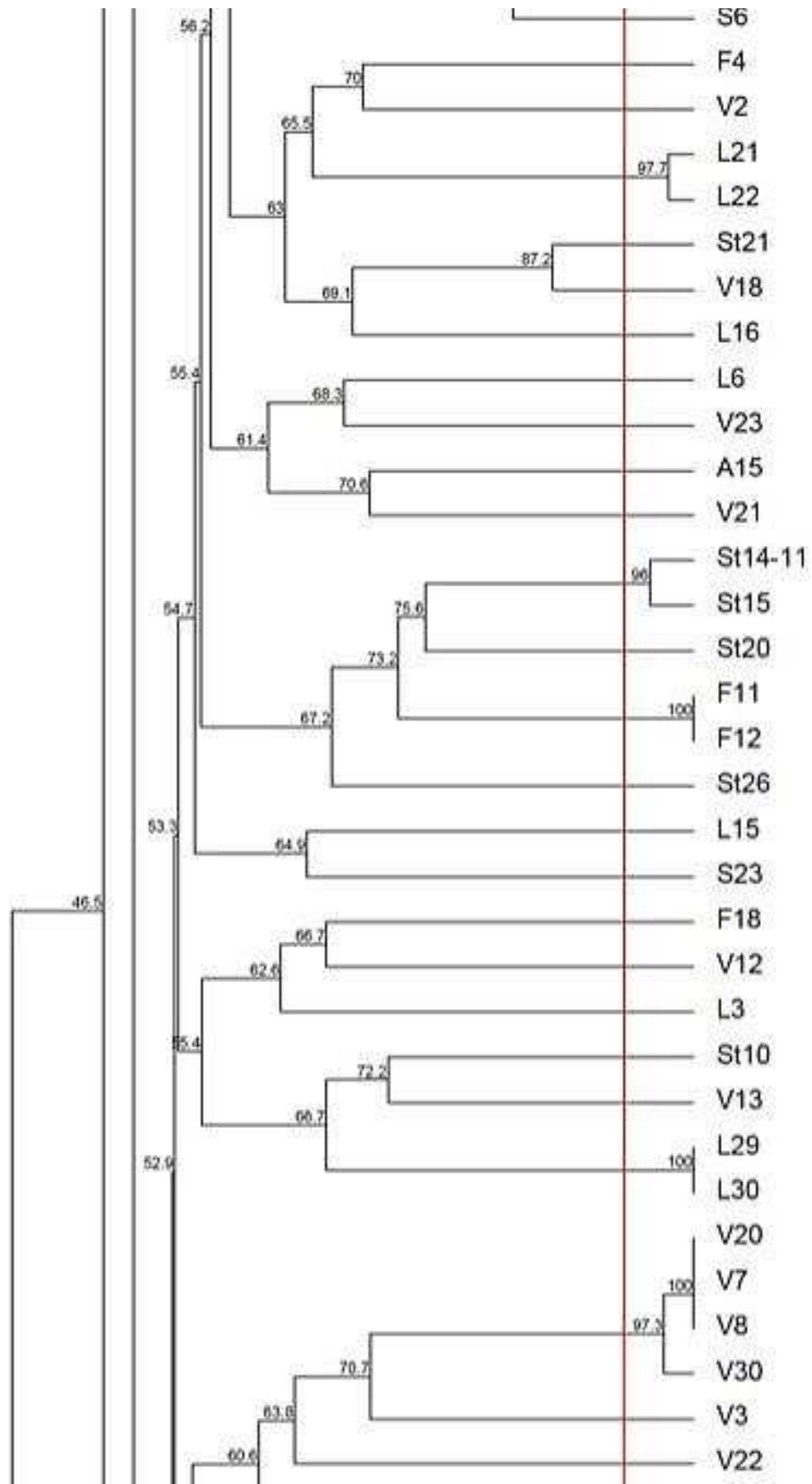
Figura 4.1 - Gráficos referentes às ufc/mL e percentagens de resistentes, para cada local de amostragem, a concentrações crescentes de TBT (0.1, 1 e 3mM). Os * indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras e o controlo ($p \leq 0.05$).

Dice (Opt0.73%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
rep









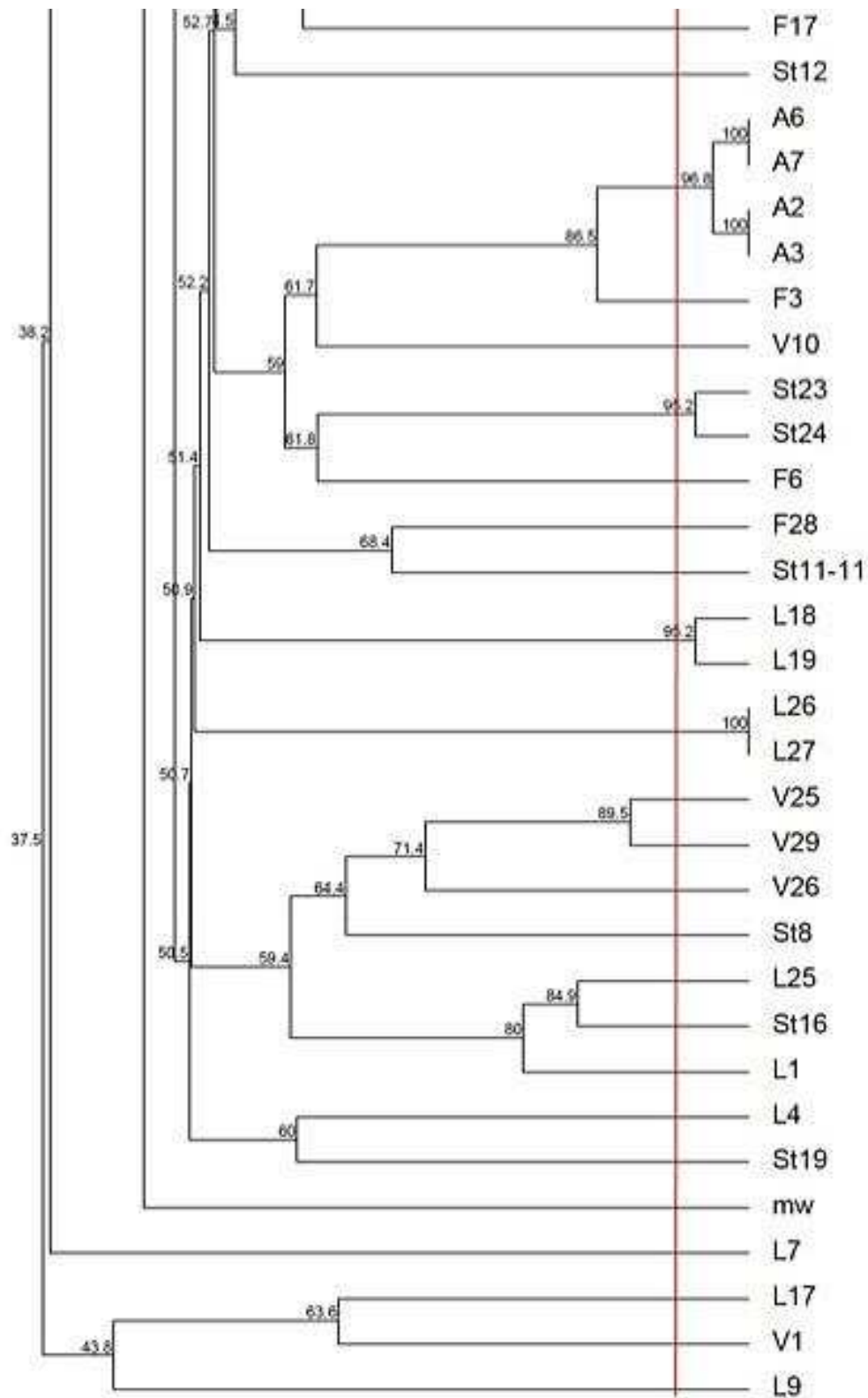


Figura 4.2 – Dendrograma da relação entre os padrões obtidos por rep-PCR, de todos os isolados, pelo método de coeficiente de Dice e UPGMA. Os perfis de isolados com valores de similaridade igual ou superior a 94% (direita da linha vermelha) foram considerados como sendo os mesmos.

4.5 Deteção de atividades enzimáticas extracelulares

Após a obtenção dos isolados diferentes, procedeu-se ao *screening* dos microrganismos produtores de lipases e proteases extracelulares. A presença de proteases extracelulares foi detetada por observação direta das placas, contendo meio *skim milk*, após o crescimento dos isolados. A formação de um halo de degradação à volta das colónias indicou a presença de proteases extracelulares (figura 4.3a). Na tabela 4.2 estão representados os isolados que produziram proteases extracelulares, sendo L23, L31, F3, F19, A2 e A11 os que apresentaram maior atividade proteolítica.

A produção de lipases extracelulares foi detetada com base no teste de rodamina B. Após o crescimento dos microrganismos, verificou-se, sob luz UV a 350 nm, a formação de um halo com fluorescência laranja à volta das colónias dos microrganismos, indicando a presença das enzimas (figura 4.3b). Os isolados F3, A2, L2 e V25 foram os que apresentaram fluorescência mais intensa, apresentando maior potencial na produção de enzimas, sendo estes seleccionados para os ensaios de otimização da atividade lipolítica.

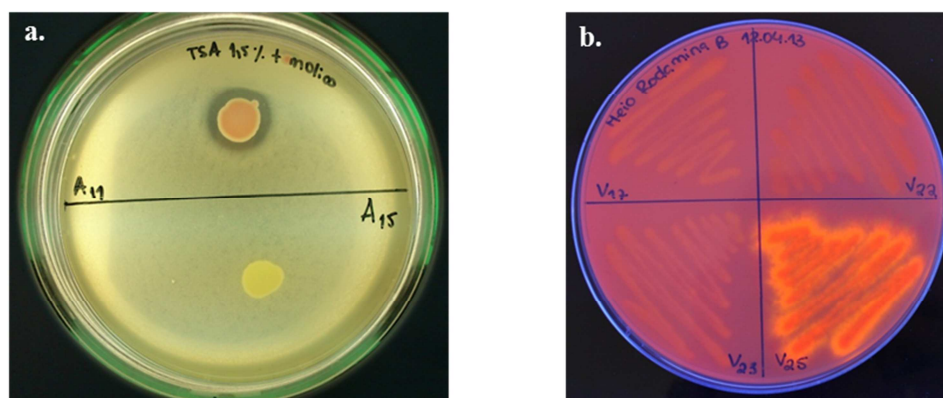


Figura 4.3 – Isolados produtores de enzimas extracelulares, após 24h e 96h de incubação, respetivamente. **a)** Isolados de Aveiro - A11 (metade superior) produz proteases extracelulares e A15 não. **b)** Isolados da Póvoa de Varzim - V25 (canto inferior direito) é o único a produzir lipases extracelulares.

Dos diferentes isolados obtidos, um total de 14 microrganismos produziram enzimas extracelulares, sendo que algumas produzem simultaneamente proteases e lipases (tabela 4.2). Para todos os locais de amostragem, pelo menos um microrganismo foi capaz de produzir uma das enzimas, com exceção de Peniche.

Tabela 4.2 – Microrganismos produtores de proteases e/ou lipases extracelulares. (+) Pouca atividade; (++) atividade intermédia; (+++) muita atividade.

Isolados	Proteases	Lipases
V25	+	+++
V26	+	+
L2	++	+++
L17	++	-
L23	+++	-
L31	+++	-
F3	+++	+++
F19	+++	++
A2	+++	+++
A11	+++	++
St21	+	-
S7	-	+
S13	-	+
S15	-	+

4.6 Análise de proteases extracelulares por zimografia

As proteases extracelulares foram caracterizadas por zimografia, utilizando como substrato a gelatina, permitindo detetar a atividade proteolítica dos extratos, mais concretamente a atividade gelatinolítica.

Por observação do gel da figura 4.4 verifica-se que os extratos de todos os isolados, com exceção de St21, foram capazes de produzir proteases capazes de degradar a gelatina.

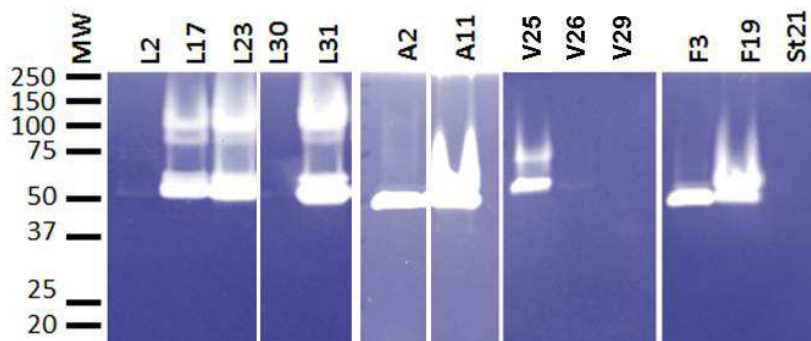


Figura 4.4 – Zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina (0.1%), de extratos dos isolados produtores de proteases crescidos em meio TSB com 1.5% de NaCl. Os extratos de L2, L30 e V29 foram utilizados como controlos negativos.

4.7 Determinação da atividade lipolítica

4.7.1 Modelação e otimização das condições reacionais para os extratos lipolíticos

Nesta etapa do trabalho, os extratos lipolíticos dos isolados, que apresentaram maior atividade em meio rodamina B, obtidos após 35h de fermentação em meio líquido, foram submetidos a ensaios distintos, de acordo com uma matriz central compósita rotativa, tendo em conta dois parâmetros físicos: a temperatura e o pH. Na tabela 4.3 encontram-se descritas as condições reacionais e os respectivos valores de atividade obtidos.

Os valores de atividade obtidos para os ensaios realizados a pH ácidos (marcados com um asterisco) foram descartados por serem inconclusivos, impossibilitando assim a modelação e otimização das condições reacionais pela metodologia de superfície resposta. Portanto optou-se por fazer uma outra abordagem com os resultados obtidos, a qual é mencionada abaixo. Para tal um ensaio adicional a pH 9 foi realizado de modo a obter-se um valor intermédio de pH, para os testes que seguem.

4.7.2 Influência da temperatura e do pH nas atividades dos extratos lipolíticos de cada isolado

Uma vez que os valores registados para pH ácidos foram inconclusivos, impossibilitando a realização da RSM, optou-se por testar a influência que a temperatura e o pH teriam nas atividades dos extratos, aproveitando os resultados obtidos nos ensaios a pH neutro e básico. A uma temperatura fixa (30°C) fez-se variar o pH (7.5, 9 e 10.5) (figura 4.5), e a um pH fixo (7.5) fez-se variar a temperatura (8.9, 30 e 52.1° C). No entanto, tendo em conta que os valores de atividade, a pH 7.5 para as temperaturas de 8.9°C e 51.2°C foram nulos (ensaios 5 e 6 da tabela 4.3), comparou-se as atividades dos extratos lipolíticos dos isolados a pH 7.5 e à temperatura de 30°C (figura 4.6).

Na tabela 4.4 encontram-se descritas as condições reacionais que foram utilizadas para esta abordagem e os respectivos valores de atividade. É possível verificar que, os extratos lipolíticos do isolado A2, não apresentam nenhuma atividade em nenhuma das condições, embora tenha apresentado uma atividade em placa com meio rodamina B.

Tabela 4.3 - Atividade lipolítica (U/mL) dos isolados F3, A2, L2 e V25, após 30 min de reação, para cada ensaio da CCRD. (n.d) indica os valores de atividade não determinados.

Ensaio	Matriz Codificada		Matriz Descodificada		Atividade lipolítica (U/mL) de isolados			
	T (°C)	pH	T (°C)	pH	F3	A2	L2	V25
1	-1	-1	15	5.5	n.d	n.d	n.d	n.d
2	1	-1	45	5.5	n.d	n.d	n.d	n.d
3	-1	1	15	9.5	3	0	3	3
4	1	1	45	9.5	1	0	0	0
5	- α	0	8.9	7.5	0	0	0	0
6	α	0	51.2	7.5	0	0	0	0
7	0	- α	30	4.7	n.d	n.d	n.d	n.d
8	0	α	30	10.5	0	0	0	0
9	0	0	30	7.5	3	0	2	3
10	0	0	30	7.5	3	0	2	4
11	0	0	30	7.5	3	0	2	2
12	0	0	30	7.5	3	0	2	3

Tabela 4.4- Influência da temperatura e o pH na atividade lipolítica (U/mL) de cada isolado.

Atividade lipolítica (U/mL) de cada isolado					
Temperatura	F3	A2	L2	V25	pH
30°C	3	0	2	3	7.5
	8	0	4	2	9
	0	0	0	0	10.5
pH					Temperatura
7.5	0	0	0	0	8.9°C
	8	0	4	2	30°C
	0	0	0	0	51.2°C

Na figura 4.5 encontram-se representados os gráficos que demonstram o efeito de diferentes pH, à temperatura de 30°C, na atividade dos extratos lipolíticos dos isolados. Pode-se observar que a pH 10.5 nenhum dos extratos apresenta atividade lipolítica. Para os extratos dos isolados L2 e F3, os valores de atividade lipolítica a pH 9 (4 U/mL e 8 U/mL, respectivamente) foram superiores aos do pH 7.5 (2 U/mL e 3 U/mL, respectivamente). Para o isolado V25 registou-se um valor de atividade lipolítica superior a pH 7.5 (3 U/mL).

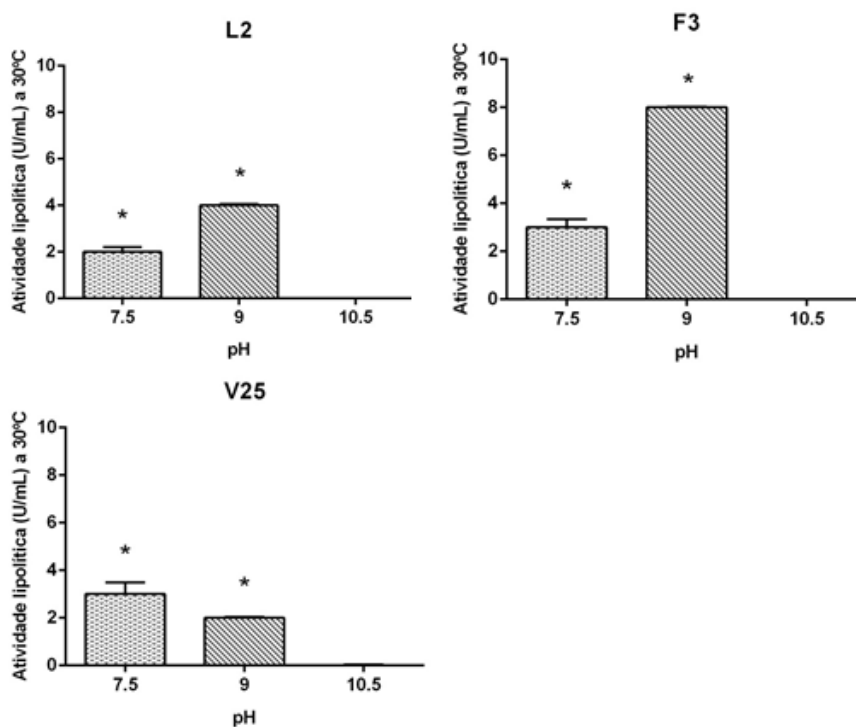


Figura 4.5 – Efeito do pH na atividade dos extratos lipolíticos dos isolados F3,L2 e V25. Os (*) indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras a $p \leq 0.05$ (ANOVA, teste de Tukey)

Pela figura 4.6, pode-se observar que o extrato do isolado F3 apresentou maior atividade lipolítica (8 U/mL) em relação aos outros extratos. No entanto, o extrato do isolado L2 apresentou o dobro da atividade do extrato V25 (2 U/mL).

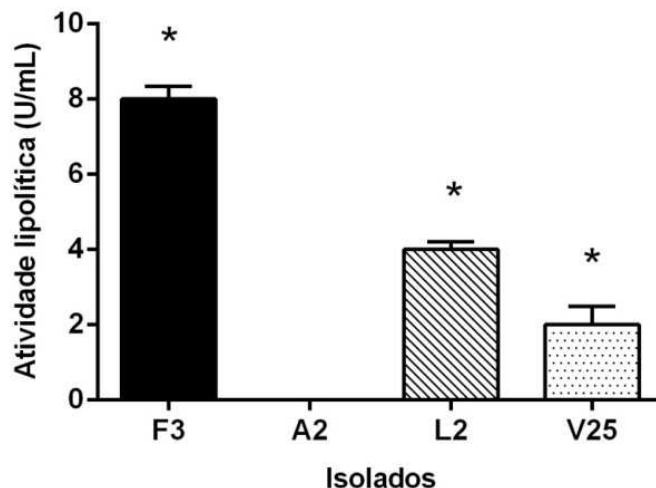


Figura 4.6 – Atividades lipolíticas dos diferentes isolados a pH 7.5 e a 30°C. Os (*) indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras a $p < 0.05$ (ANOVA, teste de Tukey).

4.8 Identificação dos microrganismos produtores de enzimas extracelulares

Os microrganismos produtores de enzimas extracelulares foram identificados por MALDI-TOF, encontrando-se os isolados e as respectivas espécies a que pertencem apresentados na tabela 4.5. Os isolados L2, L17, L31 e F19 não foram identificados, dada a sua inexistência na base de dados do *Servicio de Microbiología* do Hospital S. Pedro de Alcántara (Cáceres, Espanha).

Tabela 4.5 – Identificação das espécies dos isolados produtores de enzimas extracelulares.

Isolados	Microrganismos	Gram
V25	<i>Serratia liquefaciens</i>	Negativo
V26	<i>Serratia liquefaciens</i>	Negativo
L2	Não identificado	-
L17	Não identificado	-
L23	<i>Serratia marcescens</i>	Negativo
L31	Não identificado	-
F3	<i>Serratia marcescens</i>	Negativo
F19	Não identificado	-
A2	<i>Serratia marcescens</i>	Negativo
A11	<i>Serratia rubidaea</i>	Negativo
St21	<i>Citrobacter freundii</i> (26,8%) ou <i>werkmanii</i> (36,7%) ou <i>braaki</i> (36,3%)	Negativo
S7	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Negativo
S13	<i>Pseudomonas putida</i>	Negativo
S15	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Negativo

5. Discussão e Conclusões

No presente trabalho, um dos principais objetivos foi o de isolar bactérias marinhas resistentes a TBT. Para tal, os microrganismos foram recolhidos em sete portos, situados de norte a sul de Portugal, e submetidos a testes de crescimento em meio TSA com concentrações crescentes de TBT (0.1, 1 e 3mM).

Segundo Suehiro e colaboradores (2007), a ocorrência de bactérias resistentes a TBT poderá não estar associada à ocorrência desse contaminante no ambiente, estando os mecanismos de resistência, normalmente, relacionados com a resistência a outros compostos: fármacos (antibióticos); biocidas; corantes; detergentes; solventes orgânicos e metais pesados. Tal facto pode explicar a existência de bactérias resistentes a TBT, em todos os locais e nas diferentes concentrações de contaminante (figura 4.1 da seção 4.3), uma vez que nas amostras de água recolhidas, as concentrações de TBT registadas foram inferiores ao valor limite de deteção (50 ng/L). No entanto, ainda que as concentrações de TBT registadas tenham sido inferiores a 50 ng/L, estudos revelam que concentrações entre 1 a 2 ng/L apresentam um efeito tóxico para alguns organismos marinhos (Cruz et al., 2007).

Cruz e colaboradores (2007) realizaram um trabalho em que um dos principais objetivos foi o isolamento e identificação de bactérias resistentes a TBT, recolhidas na Ria de Aveiro (Portugal). Estes autores consideram bactérias resistentes a TBT são aquelas que crescem a concentrações a partir de 0.05mM, sendo que, as mais resistentes crescem à concentração de 3mM. Por observação da figura 4.1, verifica-se que, quanto maior a concentração de contaminante, mais tóxico e mais seletivo é o meio, sendo que apenas os microrganismos mais resistentes conseguem crescer. Embora se tenha observado a existência de microrganismos resistentes a todas as concentrações testadas, notou-se também, uma diminuição de UCF/mL e, conseqüentemente a diminuição da percentagem de microrganismos resistente. Verificou-se que a presença de TBT no meio afetou o crescimento dos microrganismos logo na concentração inicial (0.1mM), havendo uma diminuição de mais de 50% de UFC/mL em relação ao controlo, o que indica que a essa concentração o contaminante já é significativamente tóxico.

À concentração máxima de TBT (3mM), a maior percentagem de resistentes foi registada para Peniche. Estes resultados podem ser justificados, pela possibilidade de um

histórico de contaminação. Cruz e colaboradores (2007) referem-se à existência de um mecanismo de “resposta de memória” em que a exposição a um agente tóxico durante algum tempo pode aumentar a tolerância a esse agente tóxico. Embora as concentrações de compostos estanhados tenham sido inferiores ao limite de detecção, o mecanismo de “resposta de memória” pode ter sido influenciado pela presença de outros compostos tóxicos, como é o exemplo dos metais pesados (Cruz et al., 2007).

A utilização de rep-PCR na tipagem de microrganismos tem-se revelado extremamente útil na caracterização de isolados cujas espécies são desconhecidas, devido à sua simplicidade, reprodutibilidade e elevada capacidade discriminativa (Paydar et al., 2013). Este método foi utilizado para caracterizar os microrganismos resistentes à concentração de 3mM de TBT e permitiu verificar a variabilidade microbiana presente nas amostras de cada local.

Ainda que fosse expectável uma baixa variabilidade microbiana, dada à elevada concentração de TBT no meio de crescimento, o que aumenta de forma significativa a sua seletividade, de um total de 157 isolados, 111 foram caracterizados e considerados diferentes (figura 4.2 da seção 4.4). O local que apresentou maior variabilidade microbiana foi Póvoa de Varzim e Peniche foi o local com menor variabilidade, com apenas 5 isolados diferentes. As comunidades microbianas podem ser afetadas pela presença de contaminantes no meio, porém, a forma como são afetadas varia consoante a comunidade, outros fatores ambientais (pH, temperatura, entre outros), bem como o tempo de exposição a essas condições. A contaminação por metais pesados, por exemplo, pode levar a uma redução de diversidade bacteriana. No entanto, o contrário também pode verificar-se (Haller et al., 2011). A baixa diversidade microbiana observada nas amostras de Peniche pode também ser explicada pelo histórico de contaminação acima referido ou mesmo às distintas características físico-químicas que o local possui.

Os microrganismos provenientes de ambientes extremos desenvolvem mecanismos que lhes permitem evoluir e adaptar-se a condições físico-químicas extremas, podendo ser capazes de produzir enzimas ativas e estáveis nessas condições, o que lhes confere um elevado potencial a nível biotecnológico e industrial (M. Ferrer et al., 2007). Uma nova abordagem é o estudo de enzimas extracelulares de bactérias resistentes a contaminantes, no presente caso TBT. Por serem capazes de resistir à presença desse contaminante,

podem, por mecanismos associados a essa adaptação, produzir enzimas com características que as tornam únicas.

O interesse acerca das enzimas microbianas tem sido crescente devido à sua utilização a nível industrial e o facto de estarem profundamente envolvidas em diversas funções biológicas, sendo, importante a existência de métodos simples, rápidos e seletivos, que permitam detetar tais enzimas (R. Gupta et al., 2002; Morris et al., 2012). Os métodos normalmente utilizados no *screening* de microrganismos produtores de enzimas extracelulares são qualitativos, pelo que dão informação da presença ou ausência de produção de uma determinada enzima. A quantidade de enzima presente pode ser dada pela taxa de degradação (hidrólise) do substrato ou pela produção do produto (Hasan et al., 2009; Kasana et al., 2011).

A produção de proteases e lipases extracelulares pelos diferentes isolados foi estudada para as diferentes bactérias resistentes a TBT, obtidas após a caracterização por rep-PCR. Como referido anteriormente, a presença de microrganismos produtores de proteases foi detetada por observação direta das placas após o crescimento dos isolados (figura 4.3a da seção 4.5), havendo formação de um halo transparente em torno da colónia, resultante da degradação da caseína contida no *skim milk*. A deteção de proteases extracelulares por este método é muito comum, tendo sido utilizada no *screening* de microrganismos produtores de proteases alcalinas, de proteases que operam a baixas temperaturas e de proteases que operam em condições de salinidade extremas (Kasana et al., 2011).

No caso das lipases extracelulares, a produção destas foi detetada com base no teste da rodamina B, em que, após o crescimento dos isolados, verificou-se, sob luz ultravioleta, a formação de um halo com fluorescência laranja ao redor dos isolados (figura 4.3b da seção 4.5). O composto rodamina B é um corante que juntamente com os ácidos gordos, libertados pela hidrólise de triacilgliceróis presentes no meio, forma um complexo que apresenta fluorescência quando exposto à luz ultravioleta (Jette & Ziomek, 1994). Entre outros métodos utilizados na deteção de lipases extracelulares, o método de rodamina B, contendo azeite emulsionado, é considerado o melhor para a deteção de microrganismos produtores de lipases. Kouker e Jaeger (1987) desenvolveram este método de deteção em placa por forma a ser mais específico e sensível na identificação de bactérias produtoras de lipase. Para além de ser menos dispendioso, este método permite distinguir as lipases das

esterases, impedindo a obtenção de falsos positivos (Kim et al., 2001; Kouker & Jaeger, 1987).

Os microrganismos de todos os locais de amostragem produziram pelo menos uma das enzimas extracelulares, com a exceção dos microrganismos de Peniche (tabela 4.2 da seção 4.5). A baixa diversidade microbiana registada para este local pode ser uma das causas, dado que a probabilidade de se encontrarem microrganismos produtores de enzimas é menor do que para os outros locais. Por outro lado, a exposição destes microrganismos em particular a elevadas concentrações de TBT pode ter inibido a produção das enzimas extracelulares. A influência do TBT na atividade de algumas hidrolases intracelulares (ATPase, β -galactosidase e fosfatase alcalina) é conhecida, porém, tanto quanto sabemos, a sua influência não é demonstrada para as enzimas em estudo (Tseng & Cooney, 1995; White et al., 1999), nem tão pouco nos organismos em causa.

A zimografia é uma técnica de eletroforese que implica a co-polimerização de um substrato em gel de poliacrilamida, de modo a detetar e caracterizar a atividade de enzimas (Wilkesman & Kurz, 2009). Neste trabalho, esta técnica veio complementar os resultados obtidos na deteção e, para tal, a gelatina foi utilizada como substrato para a deteção da proteolítica dos extratos. Por observação do gel da figura 4.4 (seção 4.6) notou-se que alguns os extratos isolados não exibiram atividade, apesar de terem apresentado atividade em placa. A ausência de atividade nesses extratos pode ser justificada pela especificidade das proteases para com o substrato. Uma vez que o substrato utilizado foi a gelatina, essas proteases podem não apresentar atividade gelatinolítica, não sendo portanto capazes de degradar a gelatina presente no gel (Katunuma et al., 2005; Saraiva, 2009). Para alguns extratos verificou-se a presença de bandas correspondentes a mais que um peso molecular no gel. De acordo com Saraiva (2009), a presença destas bandas pode indicar a produção de proteases diferentes ou a produção das mesmas mas com conformações diferentes, levando a que tenham diferentes pontos de migração no gel. Para cada banda não é correto assumir a existência de proteases iguais, uma caracterização molecular e bioquímica mais aprofundada será necessária para uma melhor compreensão dos resultados obtidos. Contudo, sabe-se que algumas das proteases destes microrganismos apresentam especificidade de substrato, tanto para a caseína como para a gelatina. O estudo de proteases extracelulares de *Aeromonas*, realizado por Zacaria e colaboradores (2010), também demonstrou a especificidade de extratos de proteases para esses dois substratos.

Os resultados da detecção enzimática comprovaram que bactérias resistentes a TBT possuem a capacidade de produzir enzimas extracelulares. No entanto, para que o seu potencial biotecnológico fosse avaliado foi necessário analisar quantitativamente as atividades a diferentes condições de pH e temperaturas.

Como referido anteriormente, as condições de atividade de enzimas podem ser otimizadas, relacionando os fatores físico-químicos, pela metodologia de superfície resposta (Hasan-Beikdashti et al., 2012). Os extratos lipolíticos das bactérias resistentes a TBT que possuíram maior atividade em placa (F3, L2, A2 e V25) foram selecionadas para os ensaios de otimização da produção de lipases, tendo em conta dois fatores: a temperatura e o pH. Os ensaios de atividade foram realizados pelo método de *p*-NPP, nas condições de temperatura e pH obtidos através da matriz de CCRD, estando os valores de atividade registados na tabela 4.3 (subsecção 4.7.1).

O *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) é um éster de cadeia longa utilizado como substrato, em substituição a triacilgliceróis naturais, para medir a atividade lipolítica. A sua hidrólise por ação das lipases leva à libertação de *p*-nitrofenil, um composto amarelo, e a atividade é determinada por espectrofotometria UV-Visível, sendo este método rápido, específico e sensível (Gilham & Lehner, 2005; N. Gupta et al., 2002; Wang et al., 2012).

No presente trabalho, os valores de atividade lipolítica obtidos nos ensaios a pHs ácidos foram inconclusivos. Segundo Gilham e Lehner (2005), a utilização do ensaio de *p*-NPP a pHs ácidos não é muito aconselhável visto que a absorvância do *p*-NP, libertado durante a reação de hidrólise, é afetada pelo pH. Contudo, os mesmos autores sugerem que este problema pode ser contornado, aumento o pH da mistura reacional após o culminar da reação. Estudos recentes (Joseph et al., 2012; Papagora et al., 2013; Ulker & Karaoğlu, 2012) também utilizaram este método para a quantificação de lipases extracelulares a pH ácido. Neste trabalho, no final das reações a pH ácidos, adicionou-se NaOH de modo a aumentar o pH e registar-se os valores reais de absorvância. Porém, não foi possível a obtenção dos valores reais da absorvância, levando à sobrestimação da atividade lipolítica. Seria necessária a utilização de um outro método (por exemplo método titrimétrico) de modo a que fosse possível comparar e comprovar a atividade real das enzimas. Já para os ensaios a pH neutro e básicos, os valores de atividade não tiveram esta interferência, uma vez que a absorvância do *p*-NP não foi afetada.

Posto isto, não foi possível a otimização das condições de atividade por RSM, optando-se assim por uma outra abordagem. Aproveitando os resultados obtidos nos ensaios a pH neutro e básico, testaram-se as influências que a temperatura e o pH tiveram nas atividades dos extratos.

Para a temperatura fixa de 30°C fez-se variar o pH (7.5, 9, 10.5) e verificou-se que o extrato lipolítico de A2 foi o único que não apresentou nenhuma atividade (tabela 4.4 da subseção 4.7.2), embora tenha tido uma atividade significativa em meio rodamina B. A perda de atividade lipolítica registada por este extrato pode ter sido causada pelo processo de congelação a -80°C, a que os extratos foram submetidos antes da realização dos ensaios, revelando serem possivelmente mais sensíveis, apesar de alguns autores referirem que as proteínas microbianas podem ser armazenadas em condições menos ideais, sem a perda significativa da sua atividade (R. Gupta et al., 2002). Para os restantes foram registadas atividades a pH 7.5 e 9, mas não se registaram atividades a pH 10.5 (figura 4.5 da subseção 4.7.2). Tal registou-se porque, segundo, Ulker e Karaoğlu (2012), a maior parte das lipases microbianas possuem atividade, considerada ótima, numa gama de pH compreendida entre 7 a 9. Por apresentarem uma maior atividade a pH 9, as lipases de F3 (8U/mL) e L2 (4 U/mL) são consideradas lipases extracelulares alcalinas, pelo que podem apresentar aplicabilidade a nível biotecnológico, podendo ser aplicadas na indústria de detergentes (Lailaja & Chandrasekaran, 2013). Por outro lado, os extratos lipolíticos de V25 apresentaram uma maior atividade a pH 7.5, sendo consideradas lipases preferencialmente neutras.

Relativamente à influência da temperatura na atividade dos extratos, a pH 7.5, 30°C demonstrou ser a única a que os extratos apresentaram atividade lipolítica (figura 4.6 da subseção 4.7.2). Tal já era esperado uma vez que as outras temperaturas de teste (8.9°C e 51.2°C) são temperaturas extremas, previamente definidas pela CCRD (tabela 4.3 da subseção 4.7.1). Comparativamente aos outros extratos, o extrato de F3 apresentou maior atividade lipolítica (8 U/ml). Contudo, apesar de demonstrativos da capacidade ou não capacidade destas enzimas para atuarem a temperaturas extremas, a abordagem em causa não foi a mais adequada para se definir uma temperatura ótima de atividade, dado a gama pouco abrangente de valores de temperatura. Posto isto, estudos posteriores deverão ser realizados para se ajustar as gamas estudadas.

As espécies a que os isolados produtores de enzimas extracelulares pertencem foram identificadas por MALDI-TOF-MS (tabela 4.5 da seção 4.8). Foi possível verificar que alguns isolados considerados distintos por rep-PCR, pertencem à mesma espécie. Como referido anteriormente, a técnica de rep-PCR permite, não só a identificação das espécies, como também a distinção de microrganismos ao nível das subespécies (Adiguzel et al., 2009; Healy et al., 2005). Neste sentido, e apesar de se ter verificado que alguns isolados pertencem à mesma espécie, estes isolados podem pertencer a estirpes diferentes, podendo ter por isso também características metabólicas diferentes e consequentemente produzir compostos com características. Tal verificou-se para os isolados V25 e V26, sendo ambos *Serratia liquefaciens*, para os isolados L23, F3 e A2 que foram identificados como sendo *Serratia marcescens* e S7 e S15 que são *Pseudomonas oleovorans*.

As espécies identificadas, grande parte pertencentes aos géneros *Serratia* e *Pseudomonas*, são na sua maioria patogénicas, estando relacionadas a infeções hospitalares e a resistências a antibióticos (Kurz et al., 2003). Sabe-se ainda que, a produção de lipases e proteases extracelulares por microrganismos, encontra-se estreitamente relacionada com o potencial infeccioso de alguns e serem importantes nesses mesmos processos (Saraiva, 2009). Tal veio corroborar alguns dos resultados anteriormente obtidos, nomeadamente a existência de microrganismos resistentes a TBT e a produção de enzimas extracelulares pelos mesmos. Contudo, quatro bactérias não foram identificadas, visto terem sido comparadas com registos de bactérias do banco de dados Hospital S. Pedro de Alcántara em Cáceres (Espanha), pelo que poderão não estar associadas a mecanismos patogénicos e desse modo não terem sido identificadas.

O estudo realizado por Tseng e Cooney (1995) reporta a ocorrência de *Pseudomonas putida* TBT-6, *Pseudomonas sp.* BP-4 capazes de resistir a TBT, por dois mecanismos enzimáticos diferentes, isoladas de sedimentos recolhidos no Porto de Boston (EUA). Jude e colaboradores (2004) também reportaram a capacidade de *Pseudomonas stutzeri*, isolada de sedimentos do Porto Arcachon (França), resistir a TBT, associando essa resistência ao mecanismo de bomba de efluxo, situadas na membrana citoplasmática. As bactérias da espécie *Serratia liquefaciens* foram também identificadas como sendo resistentes a TBT (Jude et al., 1996). Para *Citrobacter sp.*, Cruz e colabarodores (2007) registaram crescimento da mesma a 3mM de TBT, sendo portanto resistente a esse contaminante.

Relativamente à produção de enzimas extracelulares, os géneros *Pseudomonas* e *Serratia* têm sido amplamente estudados, como fontes representativas para a produção de lipases e proteases extracelulares (Hasan et al., 2006; Kuddus & Ramteke, 2012). Embora no presente trabalho não se tenha detetado a presença de lipases para o género *Citrobacter*, Gunasekaran e colaboradores (2006) isolaram uma protease alcalina de *Citrobacter freundii*, uma das possibilidades obtidas na identificação efetuada por MALDI-TOF-MS, como uma homologia de 26.8%.

O presente estudo permitiu identificar microrganismos resistentes a TBT, com capacidade de produção enzimas extracelulares, nomeadamente lipases e proteases. As lipases extracelulares de dois isolados (F3 e L2) demonstraram ser preferencialmente alcalinas, podendo ter aplicabilidade na indústria de detergentes. Demonstrou-se que as bactérias resistentes a TBT são também capazes de produzir proteases extracelulares, provavelmente diferentes entre si. Com a identificação dos microrganismos tornou-se mais clara a capacidade de resistirem a TBT e de produzirem enzimas extracelulares, sendo essas capacidades retratadas por outros autores. No entanto, o facto de possuírem essas capacidades em simultâneo representa uma abordagem nova, não estando ainda descrita.

6. Perspetivas futuras

Visto que, e como referido ao longo do trabalho, os microrganismos possuem capacidade de resistirem e adaptarem-se a condições ambientais diversas, podendo por isso produzir enzimas com propriedades ainda não exploradas, mais concretamente à capacidade de bactérias marinhas resistentes a TBT produzirem enzimas extracelulares. Seria importante perceber quais os mecanismos que lhes permite tal adaptação e a eventual influência que o TBT em específico pode possuir na produção de lipases e proteases extracelulares.

Tendo em conta que os estudos realizados acerca das proteases extracelulares foram qualitativos, seria interessante uma análise quantitativa da atividade dessas enzimas, de modo a perceber-se o seu real potencial biotecnológico – além da avaliação da diversidade das mesmas, efetuada neste estudo. Uma vez conhecidas a maioria das espécies produtoras de enzimas extracelulares, seria também relevante a otimização dos processos de fermentação, tendo em conta as condições ótimas, de modo a maximizar-se a produção de enzimas extracelulares.

Sendo que, algumas destas bactérias produtoras de enzimas são reconhecidamente patogénicas e frequentemente associadas a multirresistências, a análise dos potenciais mecanismos de resistência a fármacos (resistência provável devido à também resistência ao composto em causa estudado) e o envolvimento das enzimas nos processos de patogénicidade – ambas (proteases e lípases) reconhecidas por estarem geralmente envolvidas neste tipo de processos - abrem-se portas para futuras aplicações na área farmacêutica.

Neste estudo, de um total de 111 microrganismos amostrados e distintos, focou-se na investigação de 14 bactérias. No futuro a identificação das restantes bactérias isoladas e a comparação do potencial de produção de enzimas entre bactérias da mesma espécie, mas de locais diferentes, e bactérias diferentes do mesmo local, seria um cenário interessante a ser analisado. Isto permitirá perceber a influência dos ambientes na adaptação dos microrganismos assim como, a sua influência no desenvolvimento de mecanismos distintos que lhes conferem um potencial acrescido, dando ainda mais relevo à importância da bioprospeção da grande diversidade de microrganismos marinhos existentes nos diferentes ambientes, habitats e nichos.

7. Referências bibliográficas

- Abedi, D., Zhang, L., Pyne, M., & Chou, C. P. (2011). 1.03 - Enzyme Biocatalysis. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (Second Edi., Vol. 1, pp. 15–24).
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., & Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 321–8.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., & Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in microbiology*, 158(2), 112–21.
- Amro, A. A., Salem, S. R., & Shabeb, M. S. A. (2009). The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2), 104–114.
- Antranikian, G., Vorgias, C. E., & Bertoldo, C. (2005). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 96, 219–62.
- Arnosti, C. (2011). Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Annual Review of Marine Science*, 3, 401–425.
- Ateba, C. N., & Mbewe, M. (2013). Determination of the genetic similarities of fingerprints from *Escherichia coli* O157:H7 isolated from different sources in the North West Province, South Africa using ISR, BOXAIR and REP-PCR analysis. *Microbiological research*, 168(7), 438–46.
- Beilen, J. B. va., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338–344.
- Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2005). Introduction to Enzyme Technology. In *Biocatalysts and Enzyme Technology* (pp. 1–26).
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: An overview. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (Vol. 861, pp. 3–30). Totowa, NJ: Humana Press.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., & Wang, X. (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology advances*, 27(3), 236–55.
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Vol. 7, pp. 1– 10). A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION.
- Cruz, A., Caetano, T., Suzuki, S., & Mendo, S. (2007). *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal. *Marine environmental research*, 64(5), 639–50.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., ... Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International journal of biological macromolecules*, 57, 232–237.

- Debashish, G., Malay, S., Barindra, S., & Joydeep, M. (2005). Marine enzymes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 96, 189–218.
- Demain, A. L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology advances*, 18(6), 499–514.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., & Golyshin, P. N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current opinion in microbiology*, 10(3), 207–214.
- Ferrer, P., Montesinos, J. L., Valero, F., & Solà, C. (2001). Production of Native and Recombinant Lipases by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(1), 221–255.
- Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2), 139–147.
- Gohel, S. D., & Singh, S. P. (2012). Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis alba* OK-5. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 889-890, 61–8.
- Gunasekaran, V., Kotay, S. M., & Das, D. (2006). Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. *Indian journal of experimental biology*, 44(6), 485–91. Retrieved from
- Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical biochemistry*, 311(1), 98–99.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 381–95.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763–81.
- Haller, L., Tonolla, M., Zopfi, J., Peduzzi, R., Wildi, W., & Poté, J. (2011). Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). *Water research*, 45(3), 1213–28.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology advances*, 27(6), 782–98.
- Hasan-Beikdashti, M., Forootanfar, H., Safiarian, M. S., Ameri, a., Ghahremani, M. H., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. a. (2012). Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(5), 670–677.
- Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., ... Lupski, J. R. (2005). Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 199–207.

- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*, *15*(1), 29–63.
- Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*, *42*, 228–240.
- Jette, J. F., & Ziomek, E. (1994). Determination of Lipase Activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay. *Analytical biochemistry*, *219*(2), 256–260.
- Joseph, B., Shrivastava, N., & Ramteke, P. W. (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *10*(1), 137–144.
- Jude, F., Lascourreges, J. F., Capdepuuy, M., Quentin, C., & Caumette, P. (1996). Evaluation of tributyltin resistance in marine sediment bacteria. *Canadian journal of microbiology*, *42*, 525–532.
- Jude, Florence, Arpin, C., Brachet-Castang, C., Capdepuuy, M., Caumette, P., & Quentin, C. (2004). TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS microbiology letters*, *232*(1), 7–14.
- Kasana, R. C., Salwan, R., & Yadav, S. K. (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Critical reviews in microbiology*, *37*(3), 262–76.
- Katunuma, N., Le, Q. T., Miyauchi, R., & Hirose, S. (2005). Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection. *Analytical biochemistry*, *347*(2), 208–12.
- Kim, E. K., Jang, W., Ko, J. H., Kang, J. S., Noh, M. J., & Yoo, O. J. (2001). Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas* sp. Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *Journal of bacteriology*, *183*(20), 5937–5941.
- Kouker, G., & Jaeger, K. (1987). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(1), 211–213.
- Kuddus, M., & Ramteke, P. W. (2012). Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Critical reviews in microbiology*, *38*(4), 330–8.
- Kurz, C. L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, P. F. G., ... Ewbank, J. J. (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *The EMBO Journal*, *22*(7), 1451–1460.
- Lailaja, V. P., & Chandrasekaran, M. (2013). Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *29*(8), 1349–60.
- Lemos, M. F. L., Esteves, A. C., & Pestana, J. L. T. (2011). Fungicides as Endocrine Disrupters in Non-Target Organisms. In D. N. Thajuddin (Ed.), *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects* (pp. 179–196).

- Macedo, G. ., Pastore, G. ., & Rodrigues, M. . (2004). Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*, 39(6), 687–693.
- Montgomery, D. C. (2007). *Design and Analysis of Experiments* (5th ed., pp. 392-430). Wiley: New York.
- Morris, L. S., Evans, J., & Marchesi, J. R. (2012). A robust plate assay for detection of extracellular microbial protease activity in metagenomic screens and pure cultures. *Journal of microbiological methods*, 91(1), 144–6.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger, Principles of Biochemistry* (4th ed., pp. 191–202) W.H Freeman and Company, New York.
- Papagora, C., Roukas, T., & Kotzekidou, P. (2013). Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, (February), 1–8.
- Paydar, M., Teh, C. S. J., & Thong, K. L. (2013). Prevalence and characterisation of potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Malaysia using conventional methods, PCR and REP-PCR. *Food Control*, 32(1), 13–18.
- Priest, F. G. (1977). Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 711–753.
- Rao, M. B., Tanksale, a M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597–635.
- Rao, Y. K., Lu, S.-C., Liu, B.-L., & Tzeng, Y.-M. (2006). Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), 57–66.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147-148, 237–50.
- Salleh, A. B., Razak, C. N. A., Rahman, R. N. Z. A., & Basri, M. (2006). Protease - Introduction. In A. B. Salleh, R. N. Z. A. Rahman, & M. Basri (Eds.), *New Lipases and Proteases* (pp. 23–39).
- Saraiva, M. R. M. (2009). *Enzimas extracelulares de fungos da família Botryosphaeriaceae*. Dissertação de Mestrado Microbiologia. Universidade de Aveiro.
- Stinson, M. W., & Merrick, J. M. (1974). Extracellular Enzyme Secretion by *Pseudomonas lemoignei*. *Journal of Bacteriology*, 119(1), 152–161.
- Suehiro, F., Mochizuki, H., Nakamura, S., Iwata, H., Kobayashi, T., Tanabe, S., ... Suzuki, S. (2007). Occurrence of tributyltin (TBT)-resistant bacteria is not related to TBT pollution in Mekong River and coastal sediment: with a hypothesis of selective pressure from suspended solid. *Chemosphere*, 68(8), 1459–64.

- Tavano, O. L. (2010). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90(2010), 1–11.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M. a., Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2009). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196.
- Tseng, R.-K., & Cooney, J. J. (1995). Action of Tributyltin on Enzymes of Four Bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(7), 1113 – 1121.
- Ulker, S., & Karaoğlu, S. A. (2012). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(4), 385–90.
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2009). Industrial Biotechnology, (overview). In *Applied Microbiology: : Industrial* (pp. 335–348). Elsevier Inc.
- Van Dedem, G., & Moo-Young, M. (1973). Cell growth and extracellular enzyme synthesis in fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 15(2), 419–39.
- Wang, D., Wang, J., Wang, B., & Yu, H. (2012). A new and efficient colorimetric high-throughput screening method for triacylglycerol lipase directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 18–23.
- White, J. S., Tobin, J. M., & Cooney, J. J. (1999). Organotin compounds and their interactions with microorganisms. *Canadian journal of microbiology*, 45(7), 541–54.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 965–74.
- Wilkesman, J., & Kurz, L. (2009). Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent patents on biotechnology*, 3(3), 175–84.
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 138(3), 663–70.
- Zacaria, J., Delamare, a P. L., Costa, S. O. P., & Echeverrigaray, S. (2010). Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zymogram analysis. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 212–9.
- Zani, M.-L., & Moreau, T. (2010). Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie*, 92(11), 1689–704.
- Zhang, C., & Kim, S.-K. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine drugs*, 8(6), 1920–34.
- Zhu, D., Wu, Q., Wang, N., & Academy, C. (2011). 3.02 Industrial Enzymes. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed., pp. 3–13).

Anexo I

Tabela I – Resultados das análises de metais nas amostras de água recolhidas. (L1 – Póvoa de Varzim; L2 – Leixões; L3 – Aveiro; L4 – Figueira da Foz; L5 – Peniche; L6 – Setúbal; L7 – Sines)

Ref ^a do Cliente	Cr (µg/L)	Mn (µg/L)	Fe (µg/L)	Co (µg/L)	Ni (µg/L)	Cu (µg/L)	Zn (µg/L)
L1	<5	<2	<50	<2	1.57E+01	<5	2.3E+01
L2	<5	1.77E+01	<50	<2	<10	<5	3.6E+01
L3	<5	<2	<50	<2	<10	<5	<20
L4	<5	<2	<50	<2	<10	<5	<20
L5	<5	<2	<50	<2	<10	<5	<20
L6	<5	<2	<50	<2	<10	<5	<20
L7	<5	<2	<50	<2	1.08E+01	<5	<20

Tabela I (cont.) – Resultados das análises de metais nas amostras de água recolhidas. (L1 – Póvoa de Varzim; L2 – Leixões; L3 – Aveiro; L4 – Figueira da Foz; L5 – Peniche; L6 – Setúbal; L7 – Sines)

Ref ^a do Cliente	Sr (µg/L)	Ag (µg/L)	Cd (µg/L)	Sn (µg/L)	Pb (µg/L)	Hg (µg/L)
L1	8.6E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5
L2	9.13E+03	<10	<1	<5	2.2E+00	<0.5
L3	8.94E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5
L4	6.54E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5
L5	9.23E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5
L6	7.65E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5
L7	9.07E+03	<10	<1	<5	<2	<0.5