

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS -  
HENRIQUE SANTILLO  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**“MORFO-FISIOLOGIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO DA  
RESERVA ECOLÓGICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS –  
ANÁPOLIS.”**

FÊNIX ARAÚJO DE OLIVEIRA

Anápolis, 2015.

FÊNIX ARAÚJO DE OLIVEIRA

**“MORFO-FISIOLOGIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO DA  
RESERVA ECOLÓGICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
GOIÁS – ANÁPOLIS.”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Anápolis, 2015.

Oliveira, Fênix Araújo de.

Morfo-fisiologia de bactérias isoladas de solo da reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás - Anápolis. – 2015.

113 folhas. il figuras.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2015.

1. Bioprospecção. 2. Bactérias. 3. Solo do Cerrado. 4. Protease. I.  
Título.

MORFO-FISIOLOGIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO DA RESERVA  
ECOLÓGICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS – ANÁPOLIS

FÊNIX ARAÚJO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 27/10/2015 por:



---

Profa. Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet (UEG)



---

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



---

Prof. Dr. Anderson Petrónio de Brito Ferreira (Embrapa)

ANÁPOLIS – GO  
OUTUBRO 2015

## AGRADECIMENTOS

- Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.
- À Professora Dr<sup>a</sup>. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet, que além da orientação desse trabalho, é sinônimo de paciência e humildade. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por toda a sua contribuição intelectual e profissional depositada durante esses anos.
- Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Neves Monteiro, pela amizade, pelo convívio, paciência e apoio.
- Aos meus pais, irmãos, toda minha família e a Gabriela que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.
- Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos: Ailton, Eva e Maurício pela ajuda ao longo do curso.
- À FAPEG pelo apoio financeiro.
- A todos aqueles que de alguma forma estiveram próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena. OBRIGADO!

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil.....	18
<b>Figura 2:</b> Imagem de satélite do local de amostragem do solo.....	51
<b>Figura 3:</b> Quantidade de bactérias isoladas do solo da reserva ecológica CCET/UEG por meio de cultura.....	60
<b>Figura 4:</b> Representação porcentual das características morfológicas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em ágar nutriente a 30°C, por 72 horas.....	62
<b>Figura 5:</b> Formação de halos de enzimáticos da atividade de celulase, lipase, protease e de solubilização de fosfato dos micro-organismos isolados do solo do CCET/UEG. (A): Halo de hidrólise das proteínas do leite pelo isolado ALT 15, (B): Halo de hidrólise de carboximetilcelulose pelo isolado APK 12, (C): Halo de hidrólise de tween pelo isolado ACT 09, (D): Halo de solubilização de fosfato inorgânico pelo isolado ANA 24 em meio Pikovskaya's.....	66
<b>Figura 6:</b> Dendrograma de agrupamento de 73 bactérias isoladas do solo de cerrado do CCET/UEG calculado pelo coeficiente de semelhança Jaccard e pelo método UPGMA. Considerando 60% de similaridade como ponto de corte, foram separados 24 grupos (G1 a G24).....	70
<b>Figura 7:</b> Formação de halos enzimáticos pelas bactérias selecionadas APK 02, ALT 15 e ALT 16 para produção de proteases em meio leite sólido juntamente com o controle sem bactéria (CNT).....	89
<b>Figura 8:</b> Células coradas por técnica de Gram e observadas por meio de microscopia em objetiva de 1000X (imersão). (A): células em forma de bacilos Gram-negativas do isolado ALT 15; (B): células em forma de bacilos gram-negativas do isolado ALT 16; (C): células em forma de bacilos gram-negativas do isolado APK 02.....	90

<b>Figura 9:</b> Curva de crescimento dos isolados bacterianos APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG obtida pelo crescimento em caldo nutriente sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.....	91
<b>Figura 10:</b> Curva de crescimento dos isolados bacterianos APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG obtida pelo crescimento em caldo leite sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.....	92
<b>Figura 11:</b> Dosagem de proteínas totais (eixo Y2) e curva de crescimento dos isolados bacterianos (eixo Y1) APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG produtoras de caseinase, obtida pelo crescimento em caldo nutriente sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.....	93
<b>Figura 12:</b> Dosagem de proteínas totais (eixo Y2) e curva de crescimento dos isolados bacterianos (eixo Y1) APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG produtoras de caseinase, obtida pelo crescimento em caldo leite sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.....	94
<b>Figura 13:</b> Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida do perfil proteico das bactérias selecionadas para produção de proteases nos meios: caldo leite e caldo nutriente. Linha 1 – Isolado APK 02 crescido em caldo leite; Linha 2 – Isolado ALT 15 crescido em caldo leite; Linha 3 – isolado ALT 16 crescido em caldo leite; Linha 4 – controle negativo caldo leite; Linha 5 – Isolado APK 02 crescido em caldo nutriente; Linha 2 – Isolado ALT 15 crescido em caldo nutriente; Linha 3 – isolado ALT 16 crescido em caldo nutriente; Linha 4 – controle negativo caldo nutriente; Linha M - marcador Protein Mark (25 a 175 kDa) - Sigma.....	96
<b>Figura 14:</b> Curva de produção de protease extracelular no extrato bruto pelas bactérias selecionadas (APK 02, ALT15 e ALT 16) utilizando azocaseína como substrato. ....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação das enzimas baseada no tipo de reação que catalisam.....	25
<b>Tabela 2:</b> Classificação das enzimas baseada no tipo de reação que catalisam.....	27
<b>Tabela 3:</b> Aplicações industriais das proteases obtidas por micro-organismos, suas aplicações e estudos onde foram utilizadas.....	35
<b>Tabela 4:</b> Análise Físico-química do solo coletado na reserva ecológica do CCET/UEG.....	52
<b>Tabela 5:</b> Contagem de bactérias nos diferentes meios de cultura a partir da amostra de solo coletada na reserva ecológica do CCET/UEG.....	58
<b>Tabela 6:</b> Análise morfológica das características de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em meio nutriente sólido a 30 °C, por 72 horas.....	105
<b>Tabela 7.</b> Produção de enzimas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, avaliados pelo índice de solubilização (IS), índice enzimático (IE) e pela capacidade de crescimento em meio NFB.....	108

## **LISTA DE ABREVIACOES**

cm - centímetro

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

DNA - cido desoxirribonucleico

EDTA - ethylenediamine tetraacetic acid

g - grama

H<sup>+</sup> - ion hidrogênio

kb - kilopares de bases

kDa - quilodalton

kg - kilogramas

km - quilmetro

L - litro

mL - mililitro

m - metro

mg - miligrama

mm - milimetro

mmol - milimol

N<sub>2</sub> - gás nitrogênio

NaCl - cloreto de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

nm - nanmetro

P.A. - para análise

pb - pares de bases

PCR - polymerase chain reaction

pH - potencial hidrogeniônico

rRNA - RNA ribossomal

RNase - ribonuclease

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

sp.- várias espécies

spp.- espécie não determinada

TBE - tampão tris/borate/EDTA

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UFC - unidade formadora de colônia

U - unidade

UV - ultravioleta

V - volts

µg - micrograma

µL - microlitro

## RESUMO

Os micro-organismos representam uma importante fonte de bioativos. Esses micro-organismos produzem enzimas que exercem papel importante em processos industriais com alto valor econômico. Apresentam uma série de vantagens em seu uso e produção. O objetivo deste trabalho foi detectar enzimas de bactérias do solo de Cerrado e identificar bactérias com alta atividade de proteases. Na primeira parte deste trabalho foram isoladas e selecionadas bactérias do solo do Cerrado goiano com potencial de produção de enzimas (proteases, celulases e lipases) e de solubilização de fosfato. A seleção nos meios de cultura gerou um total de 73 bactérias promissoras, das quais 37 foram capazes de hidrolisar proteínas; 13 demonstraram capacidade de degradar carboximetilcelulose; 13 demonstraram capacidade de degradar tween; 14 apresentaram halo de solubilização de fosfato inorgânico em meio Pikovskaya's e 15 demonstraram a mesma habilidade em meio NBRI-P. As proteases microbianas representam aproximadamente 60% das vendas mundiais de enzimas, tendo aplicação no processamento tecnológico de detergentes, cosméticos, fármacos, alimentos e bebidas, uma destas aplicações está no processo de coagulação enzimática do leite para produção de alguns tipos de queijo. Na segunda parte foram selecionadas as três melhores bactérias produtoras de proteases (APK 02, ALT 15 e ALT 16). Estas bactérias foram caracterizadas como bacilos Gram negativos de crescimento rápido. A máxima produção de caseínase pelas bactérias selecionadas foi em torno de  $750 \text{ U.mL}^{-1}$  após 96 horas de crescimento em caldo leite a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm. As enzimas produzidas foram avaliadas por SDS-PAGE e seu peso molecular foi de aproximadamente 20 kDa. Através deste trabalho foi possível verificar o potencial de utilização das bactérias selecionadas para produção de caseínases de interesse industrial.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, Bactérias, Solo do Cerrado, Protease.

## **ABSTRACT**

Microorganisms represent an important source of bioactives. These organisms produce enzymes that play an important role in industrial processes with high economic value. They have a number of advantages in their use and production. The aim of this study was to detect enzymes of bacteria in Cerrado soils and identify bacteria with high activity of proteases. In the first part of this study, bacteria of Cerrado soils from the state of Goiás with potential enzyme production (proteases, cellulases and lipases) and phosphate solubilization were isolated and selected. The selection in culture media provided 73 bacteria promising in total from which 37 were able to hydrolyze proteins; 13 demonstrated ability to degrade carboxymethyl cellulose; 13 demonstrated ability to degrade tween; 14 showed inorganic phosphate solubilization halo in medium Pikovskaya's and 15 demonstrated the same ability in NBRI-P environment. The microbial proteases constitute approximately 60% of world sales in enzymes and can be employed not only in technological processes of detergents, cosmetics, medicines, foods and beverages, but also in dairy's enzymatic coagulation process for the production of some types of cheese. In the second part, the best three proteases synthesizers bacteria were selected (APK 02, 15 and ALT ALT 16). These bacteria were characterized as Gram-negative bacilli of rapid growth. The maximum production of caseinase by the selected bacteria was approximately  $750 \text{ U.mL}^{-1}$  after 96 hours of growth in milk broth at  $30^\circ \text{C}$  and 150 rpm. The enzymes produced were evaluated by SDS-PAGE and its molecular weight was approximately 20 kDa. Through this study was possible to verify the potential of bacteria selected for the production of industrial interest caseínases.

**Palavras-chave:** Bioprospection, Bacteria, Cerrado Soil, Protease.

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	18
1. Bioma Cerrado.....	18
2. Bioprospecção.....	19
3. Micro-organismos.....	20
3.1. Micro-organismos do solo.....	22
4. Enzimas microbianas.....	24
4.1. Micro-organismos solubilizadores de fosfato.....	27
4.2. Celulases.....	29
4.3. Lipases.....	31
4.4. Proteases.....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	47
<b>Objetivos Gerais</b> .....	47
<b>Objetivos Específicos</b> .....	47
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	49
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>METODOLOGIA</b> .....	51
1. Coleta do solo.....	51
2. Análise físico-química do solo.....	51
3. Contagem e detecção de bactérias com potencial biotecnológico.....	52
4. Seleção, purificação e manutenção das bactérias.....	53
5. Caracterização morfológica das colônias isoladas.....	53
6. Teste de atividade enzimática e de solubilização de fosfato inorgânico.....	54

7. Teste de capacidade de crescimento em meio livre de nitrogênio.....	55
8. Análise de dados.....	55
9. Avaliação da diversidade pelo índice de Shannon-Weaver.....	56
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
1. Análise físico-química do solo.....	57
2. Detecção e contagem de bactérias com potencial biotecnológico.....	58
3. Isolamento, seleção e purificação das bactérias.....	60
4. Caracterização morfológica das colônias.....	61
5. Teste de atividade enzimática e de solubilização de fosfato inorgânico.....	65
6. Teste de capacidade de crescimento em meio livre de nitrogênio.....	69
7. Análise do dendrograma.....	69
8. Avaliação da diversidade pelo índice de Shannon-Weaver.....	71
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>81</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>84</b>
1. Seleção das bactérias proteolíticas e caracterização microscópica.....	84
2. Curva de crescimento nos caldos nutriente e leite.....	84
3. Determinação de proteínas totais.....	84
4. Determinação da atividade proteolítica no extrato bruto.....	85
5. Preparo das amostras proteicas para eletroforese SDS-PAGE.....	86
6. Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	86
7. Extração do DNA cromossomal.....	87
8. Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	87
9. Eletroforese em gel de agarose.....	88

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
1. Seleção das bactérias proteolíticas e caracterização por coloração de Gram.....	89
2. Curva de crescimento em caldo nutriente e meio leite.....	90
3. Determinação de proteínas totais.....	93
4. Gel de eletroforese SDS-PAGE para a avaliação do perfil proteico.....	95
5. Determinação da atividade proteolítica no extrato bruto do caldo leite.....	97
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>105</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A organização das nações unidas (ONU) define bioprospecção como sendo a pesquisa de material biológico com finalidade de explorar os recursos genéticos de forma a garantir o uso sustentável, a utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa equitativa dos benefícios advindos de sua utilização e a promoção e regulamentação de novas tecnologias, uma vez que o material biológico tornou-se um recurso e a informação genética tem valor de mercado (AZEVEDO, 2013). Esta abordagem tem sido aplicada nas variadas áreas da biotecnologia para a busca de novos produtos e elaboração de processos inovadores (LOPES et al., 2012).

A biotecnologia tem por base a busca e descoberta de recursos biotecnológicos industrialmente exploráveis. Esta é considerada uma tecnologia robusta, confiável e de baixo risco, capaz de ser implementada em grande escala por uma gama de setores industriais. Também é considerada uma das tecnologias-chave para o desenvolvimento no século XXI, pois apresenta um forte impacto nos principais problemas globais tais como doenças, desnutrição e poluição ambiental, e é uma forma de tornar processos industriais sustentáveis (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Através de trabalhos cooperativos, nos últimos anos, observou-se um aumento significativo de pesquisas em biotecnologia focando a bioprospecção, empregando as técnicas de biocatálise e biotransformações (ANDRADE; PIOVAN; PASQUINI, 2009).

O interesse industrial por novas fontes de enzimas utilizadas em processos de baixo impacto ambiental, como fontes de biocatalisadores, tem contribuído para o desenvolvimento de estudos envolvendo a triagem de micro-organismos, que vem sendo realizados através da bioprospecção de atividades metabólicas de enzimas (ROMERO; BAIGORI; PÊRA, 2007).

É reportado na literatura que as bactérias produzem uma gama de enzimas de interesse biotecnológico, dentre elas destacam-se as classes das oxirredutases, transferases, hidrolases, isomerases e ligases (SENA et al., 2006). Embora tradicionalmente, as enzimas mais estudadas sejam de origem animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam maior interesse, do ponto de vista da sua aplicação industrial. Essas podem ser mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação por serem mais expressas (clonagens) em organismos de cultivo já estabelecidos. Outro ponto positivo é a enorme diversidade

microbiana de enzimas existentes que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas áreas (SENA et al., 2006).

Paralelo à bioprospecção de enzimas para a aplicação industrial temos também a busca por comunidades bacterianas que apresentam capacidade solubilizar fontes de fósforo de baixa solubilidade, com o objetivo de melhorar a disponibilidade deste nutriente no sistema solo-planta. Dentre os macronutrientes requeridos pelas plantas o fósforo é o que mais limita a produtividade agrícola nacional devido a sua baixa solubilidade nos solos em condições naturais (SOUZA; LOBATO; REIN, 2004).

Para suprir essa necessidade, a utilização de fertilizantes químicos é uma maneira rápida de fornecer os nutrientes para a planta. Com o aumento da população mundial, o uso acelerado da adubação química tem aumentado, contribuindo para efeitos desfavoráveis como lixiviação e eutrofização dos ecossistemas aquáticos e aumento da poluição ambiental. Uma alternativa para amenizar esse problema é a utilização de micro-organismos eficazes na liberação do fosfato insolúvel para a utilização em programas de biofertilização na agricultura brasileira (GOMES et al., 2010; SILVA, 2012).

Dentro deste contexto, este projeto visou à utilização de micro-organismos do solo do Cerrado goiano como fonte de produção de moléculas com potencial biotecnológico, a partir do momento em que se constata a necessidade de novos micro-organismos e de suas biomoléculas com aplicação nas indústrias, no melhoramento da agricultura e nas diversas áreas biotecnológicas.

No primeiro capítulo deste trabalho, é apresentado o isolamento e caracterização de bactérias do solo do Cerrado coletado no CCET/UEG, visando a bioprospecção quanto à produção de enzimas de interesse industrial e ambiental, como as celulases, proteases e lipases, bem como a avaliação da presença de bactérias solubilizadoras de fosfato. Além disso, visa calcular a diversidade microbiana das bactérias isoladas, a determinação da similaridade das bactérias isoladas e a diversidade pelo índice de Shannon-Weaver.

No capítulo 2, foram utilizadas as bactérias derivadas da bioprospecção para a produção de proteases, sendo avaliadas 3 bactérias quanto a coloração de Gram, quanto ao crescimento em dois meio de culturas, quanto a produção de proteínas e atividade de caseinase. Ainda foi realizada a avaliação do perfil proteico total por SDS-PAGE observando as proteínas expressas na presença de caldo leite e caldo nutriente. Foram determinadas as

proteínas mais expressas que possivelmente são caseinases neutras, nas diferentes bactérias testadas indicando que estas podem ser promissoras para a produção de protease com utilização biotecnológica.

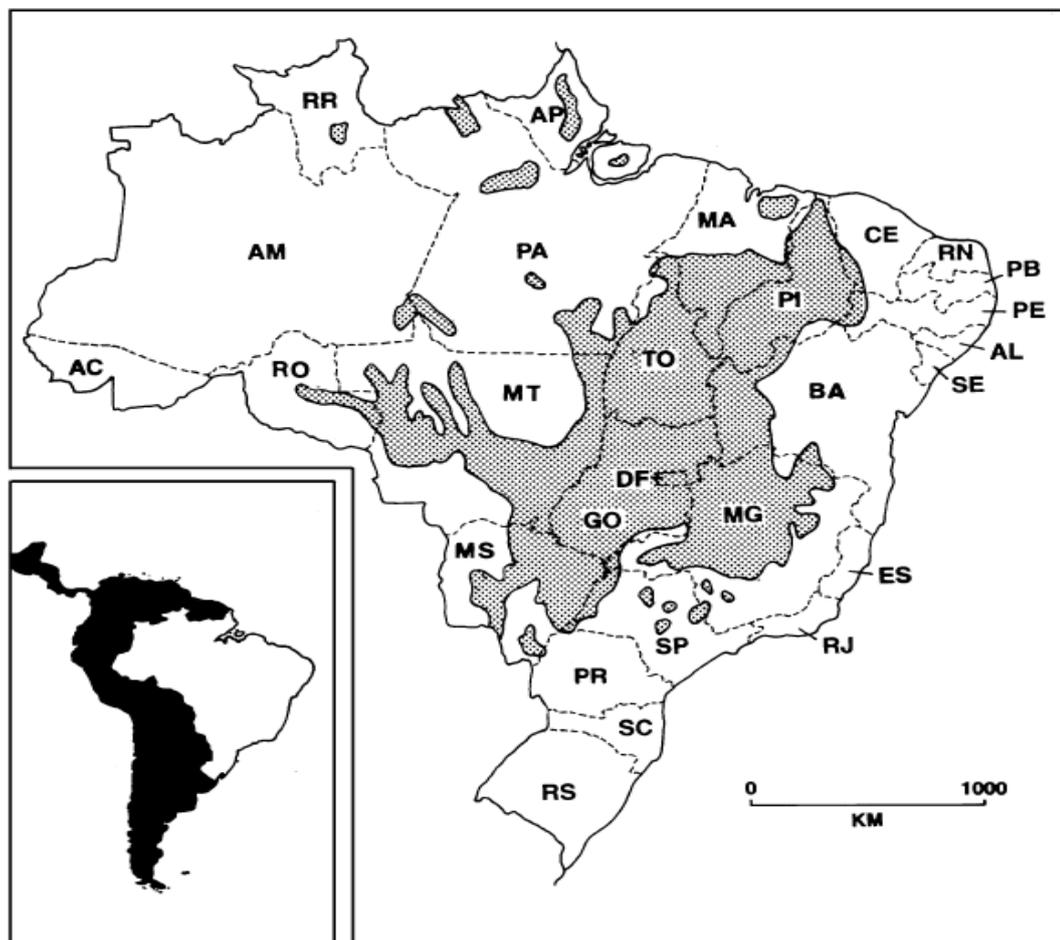
## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. Bioma Cerrado.

O Bioma Cerrado compreende um dos maiores biomas da América do Sul o que corresponde a um ecossistema de 2.000.000 km<sup>2</sup>. Estende-se por áreas do Brasil, Bolívia e Paraguai representando 25% do território nacional brasileiro. O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (KLINK; MACHADO, 2005).

A sua área incide sobre os estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Minas Gerais, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além de enclaves do Amapá, Roraima e Amazonas (Figura 1). Neste território encontram-se as nascentes das três bacias hidrográficas (Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata), o que resulta numa grande disponibilidade de recursos hídricos (MENDONÇA et al., 2008).

**Figura 1.** Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil



Fonte: RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997.

Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo (MENDONÇA et al., 2008). Apresenta uma grande riqueza biológica estimada em 160.000 mil espécies de plantas e animais, que corresponde 5% da flora e fauna mundial. Como característica, este bioma apresenta uma vegetação peculiar, verões quentes e chuvosos e invernos suaves e secos. A precipitação média é de 1.500 mm, suas temperaturas variam em média de 22 °C a 27 °C (PEIXOTO et al., 2010).

Os solos do Cerrado apresentam determinadas características comuns como elevada acidez, deficiência de nutrientes, altos teores de alumínio e alta capacidade de fixação de fósforo (GUCKER; BOECHAT; GIANI, 2009). Além da grande importância ecológica e econômica, pouco se sabe sobre a biodiversidade do Cerrado, especialmente a diversidade microbiana do solo (CASTRO et al., 2008). Uma maneira de aumentar o conhecimento sobre a diversidade microbiana do solo promovendo a aplicação de seus insumos é iniciada a partir de ferramentas como a bioprospecção (CASTRO et al., 2008).

## *2. Bioprospecção.*

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis, a procura da biodiversidade que possa ser explorada. É o passo inicial em um projeto biotecnológico, no entanto tão crucial quanto qualquer outra etapa neste processo (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; LOPES et al., 2012).

Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções, e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; LOPES et al., 2012).

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagem em relação aos processos químicos convencionais (BISPO, 2010). As práticas de bioprospecção proliferam na medida em que companhias farmacêuticas e de biotecnologia em geral se engajaram em coletar e selecionar recursos biológicos e genéticos por todo o mundo (DEDEURWAERDERE, 2005). O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais (BISPO, 2010).

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de diferentes micro-organismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de produtos nas áreas alimentícias, saúde, meio ambiente e industrial vem crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA K. et al., 2006).

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos micro-organismos e das moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário, bem como com a conservação dos recursos genéticos que eles fornecem. Consequentemente, o aumento da diversidade de compostos químicos para os diferentes setores industriais está associado com a exploração da diversidade microbiana e são muitos os benefícios científicos esperados como resultado desta exploração (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998; OLIVEIRA K. et al., 2006).

Para serem utilizados em processos biotecnológicos, espera-se que os micro-organismos apresentem as seguintes características gerais (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995; SCHMIDELL et. al., 2001):

- a) não ser patogênicos e/ou toxigênicos;
- b) apresentar elevada eficiência na transformação do substrato em produto;
- c) permitir o acúmulo do produto no meio;
- d) não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- e) apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- f) não exigir condições de processos laboriosas;
- g) não exigir meios de cultura dispendiosos;
- h) permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Além disso, para a célula, há sempre a tendência de aperfeiçoar o crescimento em detrimento da síntese do produto, motivo pelo qual não basta verificar se a célula cresce, mas se ela continua a acumular o produto de maneira eficaz (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

### *3. Micro-organismos.*

Os micro-organismos estão presentes nos mais variados habitats da terra, essa habilidade é devida à sua diversidade metabólica, isto é, diferentes micro-organismos podem usar uma variedade de fontes de energia e se desenvolver em diferentes condições físicas e

químicas. A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seus ambientes, assim sendo, os micro-organismos detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Possuindo alta variabilidade metabólica e a capacidade de realizar interações com as estruturas físicas e químicas do solo, os micro-organismos do solo atuam no controle biológico de patógenos, associados com as raízes, podem influenciar na solubilização de minerais e auxiliar a estruturação e agregação do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

Responsáveis pela ciclagem dos compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes ambientais, os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido caracterizados (ROSSELÓ-MORA; AMMAN, 2001; STURSA et al., 2009).

Por apresentar uma notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética os micro-organismos tornaram-se uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. São muitos os exemplos de utilização dos recursos microbianos pelo homem em diversas atividades de importância socioeconômica como na área industrial. Os micro-organismos podem ainda ser empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado. Na agropecuária, destacam-se os micro-organismos fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas e vetores; já na área ambiental, as perspectivas estão fundamentadas na biorremediação para a recuperação ambiental, tratando-se de uma técnica bastante promissora e dependente de novos isolados (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004).

Movimentado bilhões de dólares a cada ano na indústria de enzimas, os micro-organismos e seus bioativos apresentam altos potenciais e valor agregado pela sua aplicação direta nos processos biotecnológicos, e são muito menos associados aos problemas ambientais e sociais decorrentes do tratamento de resíduos industriais e poluição ambiental (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004; OLIVEIRA K. et al., 2006). Uma fonte para a promoção de novos produtos tecnológicos para as aplicações industriais são os micro-organismos do solo.

### 3.1. *Micro-organismos do solo.*

A comunidade microbiana do solo desempenha um importante papel na ciclagem de nutrientes, ela é o principal componente biológico responsável pela decomposição da matéria orgânica, produção do húmus, realização do ciclo de nutrientes no solo (incluindo a fixação de nitrogênio atmosférico), produção de compostos complexos que contribuem para agregação do solo, decomposição de xenobióticos, controle biológico de pragas e doenças e fornece estruturação física ao solo (BALOTA et al., 2003).

Parâmetros microbiológicos podem ser utilizados para avaliar a fertilidade do solo, alguns desses parâmetros são: a biomassa do solo, a diversidade dos micro-organismos do solo, o número de micro-organismos presentes no solo, nitrificação, decomposição da celulose, liberação de CO<sub>2</sub>, fixação biológica de nitrogênio, potencial de oxidação-redução e atividade catabólica (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

A biomassa microbiana do solo é a fração viva do solo responsável pelos processos bioquímicos e biológicos no solo, podendo ser alterada pelas condições impostas pelo ambiente de forma bastante sensível. Tais variações estão diretamente ligadas ao regime hídrico, ao clima da região, à estrutura e ao manejo do solo, e ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais aportados (BALOTA et al., 2003; CASTRO et. al., 2008). As bactérias representam a maioria da biomassa microbiana do solo com contagens entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> UFC por grama de solo seco. Esses dados se referem apenas ao número de bactérias cultiváveis, já que existe uma dificuldade em reproduzir condições ideais para o cultivo *in vivo* para a maioria desses micro-organismos (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998).

A diversidade, ou biodiversidade, é um atributo das comunidades biológicas que deve ser estimado para que possamos compará-las com outras comunidades. O conceito de diversidade de espécie pode ser avaliado por meio de dois componentes: riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes; e uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância (ODUM, 1998). Ao longo do desenvolvimento da ciência, vários índices têm sido propostos, tais como Simpson (1949), Margalef (1958), Shannon e Weaver (1949), para o estudo do comportamento da diversidade de comunidades diferentes, permitindo uma avaliação da dinâmica populacional frente a diferentes regiões.

As seleções de indicadores da qualidade de solo devem integrar as propriedades químicas, físicas e biológicas, devem ser sensíveis ao manejo e as variações climáticas (HILL et al., 2000).

A diversidade de micro-organismos como indicador da qualidade do solo vem sendo estudada e o surgimento das técnicas de biologia molecular e caracterização bioquímica, tem favorecido a determinação das comunidades microbianas (TIEDJE et al., 2001). A atividade biológica do solo está intimamente associada com a estabilidade física do solo. Vários estudos mostram o impacto da composição do solo sobre a diversidade da comunidade microbiana (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011; YINGHUA et al., 2012; ZHAO et al., 2012; BRACKIN et al., 2013).

Os micro-organismos possuem uma grande capacidade de resistir ao “estresse” (resistência) e posteriormente, se recuperar (resiliência), definindo a estabilidade do ecossistema. O conceito de estabilidade biológica tem sido demonstrado em ambas características do solo: físicas e biológicas (ZHANG et al., 2010).

A estrutura e diversidade das comunidades microbianas do solo desempenham um papel fundamental na função e viabilidade dos solos. Portanto, as alterações quantitativas e qualitativas, na composição da microbiota do solo podem servir como indicadores importantes e sensíveis às mudanças de curto e longo prazo na saúde do solo (BRACKIN et al., 2013).

Os micro-organismos do solo podem ser classificados de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema. De acordo com a classificação temos os micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, desnitrificadores, amonificadores), ciclo do carbono, ciclo do fósforo, ciclo do enxofre entre outros (TORSVIK; OVREAS, 2002; CHAER et al., 2009; PEIXOTO et al., 2010).

O isolamento e a identificação de micro-organismos a partir de fontes naturais têm sido uma ferramenta proficiente na obtenção de estirpes aplicáveis e geneticamente estáveis (ADNAN; TAN, 2007). O estudo da diversidade microbiana do Cerrado pode amenizar o efeito das alterações neste Bioma, bem como descobrir novos micro-organismos e seus bioativos para aplicações biotecnológicas em diversas áreas de interesse (PIMENTA et al., 2009).

#### 4. Enzimas Microbianas

Enzimas são catalisadores biológicos, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A conformação e a estabilização da estrutura molecular são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. As condições de pH, temperatura e força iônica do meio afetam a estrutura das enzimas e conseqüentemente suas propriedades. As enzimas atuam diminuindo a energia de ativação de uma determinada reação, promovendo uma obtenção mais rápida do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor do que a velocidade das reações catalisadas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Algumas enzimas são capazes de aumentar em até  $10^{14}$  vezes a velocidade de determinadas reações, sem requerer condições extremas de pH, temperatura e pressão. Estas têm sua atividade determinada pelas características estruturais das proteínas. Cada enzima tem seu próprio mecanismo de catálise, uma vez que elas são altamente específicas (CAMPBELL, 2000).

As enzimas são divididas em seis classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam (Tabela 1). Essa classificação foi uniformizada pela Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (CARNEIRO, 2003).

A aplicação da tecnologia enzimática atualmente é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais que utilizam enzimas apresentam menor impacto ambiental e também um menor consumo energético, visto que as enzimas são biodegradáveis, e sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. As enzimas podem ser utilizadas para substituir produtos químicos nos processos catalisados por compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente provocando o desgaste de materiais (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas baseada no tipo de reação que catalisam.

<b>Classificação</b>	<b>Reação que catalisam</b>	<b>Enzimas</b>
Oxido-redutases	Reações de óxido-redução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para outro.	hidrogenases, oxidases, peroxidases, hidroxilases, oxigenases.
Transferases	Reações de transferência de grupos específicos de um composto para outro.	aminotransferases, acetiltransferase, cinases, fosforilases.
Hidrolases	Reações hidrolíticas.	lipases, proteases, amilases, pectinases.
Liases	Reações reversíveis, não hidrolíticas de remoção de grupos da molécula de substrato.	descarboxilases, aldolases.
Isomerases	Reação de isomerização transformam isômeros entre si.	glicose-isomerase.
Ligases	Reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	piruvato carboxilase.

Fonte: CARNEIRO, 2003; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006.

A maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida a partir de micro-organismos, por processos fermentativos (RAO et. al., 1998).

As enzimas de origem microbiana apresentam vantagens em relação às equivalentes de origem animal ou vegetal, como, por exemplo, menor custo de produção, maior facilidade de produção em larga escala, características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas ao hábitat e à fisiologia dos micro-organismos produtores, possibilidade de manipulação genética e representam um recurso renovável (OLIVEIRA A. et al., 2006). A identificação de novas fontes microbianas é de grande interesse, pois garante o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, e tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Muitos micro-organismos foram isolados na natureza e são utilizados industrialmente para produção de enzimas (Tabela 2). Estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias foram avaliados e identificados como produtores de enzimas de interesse industrial (BRAVO et al., 2000).

Em decorrência das necessidades e tendências da substituição das etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes, da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos e/ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis, prevê-se um aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional (POLITZER; BON, 2006).

O mercado de enzimas industriais está dividido em três grandes segmentos. O primeiro seguimento são as enzimas para alimentos e bebidas, decorrente do crescimento devido à procura por novas aplicações na área de laticínios e panificação. Já o segundo segmento são as enzimas técnicas, destinadas especialmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza. Por fim o terceiro segmento são as enzimas para ração animal, o qual o crescimento tem sido vertiginoso devido ao grande interesse dos criadores em aumentar o valor nutricional das rações e facilitar sua digestão (BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

A tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, cenário importante para a inserção do Brasil no mercado internacional (POLITZER; BON, 2006).

O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do panorama mundial), pode revelar grande potencial, pois o Brasil gera uma enorme quantidade de resíduos agroindustriais. Além disso, as indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e papel também se beneficiariam com um mercado de enzimas mais expressivo. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como parêlo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, pectinases (Tabela 2), (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007) e as principais empresas produtoras de enzimas são: a multinacional de biotecnologia Novozymes, Gist-Brocades e Genencor Internacional Inc. (FOCUS ON CATALYSTS, 2011).

**Tabela 2.** Classificação das enzimas baseada no tipo de reação que catalisam.

Enzimas	Fontes de micro-organismos	Atuação	Aplicações
Amilase	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Bacillus</i> sp.; <i>Microbacterium imperiale</i> .	Hidrólise do Amido.	Amolecimento de massas; auxílio na produção de açúcares para fermentação.
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Clostridium</i> sp.; <i>Bacillus</i> sp.; <i>Trichoderma</i> spp.	Hidrólise de celulose.	Liquefação de frutas para produção de sucos.
Lipase	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Candida</i> sp.; <i>Rhizopus</i> sp.; <i>Bacillus subtilis</i> .	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol.	Tempero em produtos de queijo, modificação da função da gordura por interesterificação.
Pectinase	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Erwinia</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Penicillium funiculosum</i> .	Hidrólise da pectina.	Clarificação de sucos de frutas por despectinização.
Protease	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Cryphomectria parasítica</i> ; <i>Penicillium citrinum</i> ; <i>Bacillus</i> sp.; <i>Rhizopus niveus</i> .	Hidrólise de proteínas de animais e vegetais; hidrólise de glúten de trigo.	Coagulação do leite para fabricação de queijo; produção de hidrolisados para sopas; melhoria da massa do pão.

Fonte: Adaptado de AQUARONE et al., 2001 e FELLOWS, 2006.

#### 4.1. Micro-organismos solubilizadores de fosfato

O fósforo (P) é, assim como o nitrogênio, um macronutriente limitante para o crescimento e a produção de culturas agrícolas (VANCE; UHDE; ALLAN, 2003). Ele está envolvido em funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de tradução de sinais (ABEL; TICCONI; DELATORRE, 2002; RAUSCH; BUCHER, 2002; SCHUNMANN et al., 2004).

O fósforo é o nutriente de menor abundância e mobilidade no solo para as plantas (TAKAHASHI; ANWAR, 2007). Alguns solos possuem níveis elevados de fosfato total, porém eles podem ser deficientes devido à baixa taxa de fosfato solúvel disponível (GYANESHWAR et al., 2002), sendo necessária a utilização de fertilizantes a base deste elemento.

O P é aplicado ao solo na forma de fertilizantes fosfatados. Cerca de 5 a 30% dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos são aproveitados pelas plantas e uma parte significativa é reduzida por reações físico-químicas no solo (TROLOVE et al., 2003). No entanto, uma grande porção de fosfato inorgânico (Pi) solúvel, aplicado ao solo como adubo químico, é rapidamente imobilizado sob as formas de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), fosfato de ferro ( $\text{FePO}_4$ ) e fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ). Sob tais formas o fosfato não é assimilado de forma eficiente pelas plantas, demandando aplicação excessiva de adubos fosfatados nas áreas de cultivo (OMAR, 1998).

Os recursos globais de fertilizantes fosfatados economicamente acessíveis vão se esgotar, resultando em aumento de custo dos fertilizantes fosfatados, bem como na sua escassez (ISHERWOOD, 2000). Para evitar uma possível escassez de P, especialmente em economias menos competitivas, estratégias de melhoria na produtividade de diversas culturas devem ser desenvolvidas com abordagens sustentáveis de aplicação de cultivares em ambientes de baixa fertilidade, melhorando sua capacidade de aquisição de nutrientes (LYNCH, 2007; BEDDINGTON, 2010).

Os fertilizantes químicos têm impactos e custos crescentes. A utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato insolúvel é apresentada como uma possibilidade vantajosa e sustentável para práticas agrícolas (GYANESHWAR et al.; 2002). Esses micro-organismos podem ainda promover o crescimento da planta secretando sideróforos, hormônios de plantas como o ácido indolacético (AIA) e a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase. ACC é o precursor imediato do hormônio etileno. Essa enzima pode estimular o crescimento vegetal e o comprimento das raízes, em particular, sequestrando e hidrolisando ACC das sementes em germinação, diminuindo, conseqüentemente, a concentração de etileno nas sementes. (ESASHI, 1991; SELVARAJ; MADHAIYAN; SA, 2008; LOPES et al., 2012).

A inoculação do solo com micro-organismos solubilizadores de fosfato podem solubilizar o P insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos de baixo peso molecular (TAHA et al., 1969), podendo também atuar como agentes quelantes (LIN et al., 2006). Outro mecanismo de solubilização de P é a extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ) (ILLMER; SCHINNER, 1992), a produção de exopolissacarídeos (BARBERI et al., 2004) e a produção de sideróforos (YU et al., 2011).

As populações de micro-organismos solubilizadores de fosfato existentes nos solos estão entre  $10^4$  e  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de solo da rizosfera de diversas leguminosas (SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002). A eficiência na solubilização pode diferenciar gêneros e famílias de micro-organismos. (SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002).

Dentre os diferentes grupos de micro-organismos do solo que possuem potencial na solubilização de fosfato, são destacadas as bactérias do gênero *Rhizobium* (SRIDEVI; MALLAIAH, 2009), *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Erwinia* (VERMA; LADHA, 2001; GARG et al., 2001), *Paenibacillus* (WANG et al., 2012) e *Bacillus* (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Entre os fungos os mais citados são o *Aspergillus* e *Penicillium* (SOUCHIE; ABOUD, 2007; LIAN et al., 2008).

A habilidade dos micro-organismos solubilizar P possibilita o aumento do fósforo disponível para as plantas (leguminosas e não leguminosas), auxiliando no papel fundamental no ciclo biogeoquímico do P em ecossistemas naturais e agrícolas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; ZENG et al, 2012).

Assim a busca de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato no solo do Cerrado é uma estratégia que pode levar a identificação de micro-organismos que poderão ter aplicação na área agrícola.

#### 4.2. Celulases

A celulose é um polímero de glicose com ligações  $\beta$  - 1,4 sendo o maior componente da biomassa vegetal, sendo o biopolímero mais abundante da natureza, e, portanto, é uma fonte sustentável de combustível e de material para processos industriais (JARVIS, 2003; MANSFIELD; MEDER, 2003).

A biomassa celulósica, proveniente de plantas cultivadas ou, alternativamente, resíduos agroindustriais, tem sido o foco de numerosas pesquisas científicas e pesados investimento de muitos setores industriais nas últimas décadas (KIM; KANG; LEE, 1997; LYND et al., 2002; MALHERBE; CLOETE, 2002; HOWARD et al., 2003). A intensificação dos esforços de pesquisa e magnitude de investimento é plenamente justificada pela importância desse recurso natural, que é considerado o único ciclo de reposição suficientemente rápido para sustentar o crescimento na demanda por aplicações tradicionais (fabricação de papel, biomassa-combustível, compostagem, ração animal entre outros), além

da crescente demanda mundial por biocombustíveis e outras *commodities* químicas, que representam novos mercados para lignocelulose. Entre eles o mais proeminente é a conversão em carreadores de energia como o etanol combustível (KIM; KANG; LEE, 1997; LYND et al., 2002; MALHERBE; CLOETE, 2002; HOWARD et al., 2003).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas, sendo classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular - Comitê Internacional de Enzimas com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulose avaliada (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

As celulasas são enzimas que clivam as ligações  $\beta$ -1,4 da celulose. Elas podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e por bactérias e fungos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose. As celulasas são de vários tipos e elas operam sinergicamente para a hidrólise da celulose (SANTOS, 2011).

Existem três tipos de enzimas envolvidas na hidrólise completa da celulose (SUKUMARAN et al., 2005): as celobiohidrolase ou exoglucanases (EC 3.2.1.9.1), as Endo- $\beta$ -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4) e as  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). Endoglicanases ou celobiohidrolase clivam ligações internas ao acaso, no local amorfo de polissacarídeos de celulose gerando novas cadeias de oligossacarídeos. Exoglicanases atuam nos terminais redutores e não redutores das cadeias de celulose liberando glicose, celobiose ou celooligossacarídeos como produtos principais. Glicosidades hidrolisam celodextrinas solúveis e celobiose em glicose (SUKUMARAN et al., 2005).

As celulasas, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos micro-organismos para que estes cresçam em celulose (LEE; KOO, 2001). Alguns gêneros de bactérias citados na literatura, que apresentam atividade celulolítica, incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas*, *Acetivibrio* e *Bacteriodes* (ROBOSON; CHAMBLISS, 1989). Recentemente, uma variedade de bactérias tem sido relatada como produtoras de celulasas, incluindo *Bacillus* sp. (MAWADZA et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (LEE et al., 2008), *Bacillus subtilis* (KIM et al., 2009) e *Marinobacter* (SHANMUCHAPRIYA et al., 2010).

De um modo geral, micro-organismos degradadores de celulose e suas enzimas têm tido aplicações e um enorme potencial biotecnológico para uma variedade de indústrias, tais

como químicas, de combustíveis, de alimentos processados, de bebidas e vinhos, de ração animal, têxtil, de papel, entre outras (LOPEZ et al., 2007).

Além disso, muitos processos mediados por enzimas celulolíticas têm sido utilizados como alternativa a tratamentos químicos já estabelecidos ou como adjuvantes na eficácia dos mesmos. Fato que contribuiu significativamente para a expansão da demanda por enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, para a intensificação de pesquisas cuja finalidade é a obtenção de micro-organismos celulolíticos que produzam estas enzimas em grande quantidade e o desenvolvimento de processos de fermentação mais eficientes para produção de enzimas (LOPEZ et al., 2007).

#### 4.3. Lipases

As lipases são biocatalisadores pertencentes à classe das enzimas hidrolases e têm como nome sistemático triacilglicerol acil-hidrolase (E.C 3.1.1.3) (KAPOOR; GUPTA, 2012).

As lipases são definidas por sua capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicéris de longa cadeia acila com a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos, atuando numa interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. No entanto, em baixas concentrações de água, as lipases podem catalisar a síntese e a transesterificação de ésteres (ANGKAWIDJAJA; KANAYA, 2006). Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acil-hidrolase, colesteolesterase, tioesterases e outras) (CARVALHO et al., 2003).

Embora o termo “cadeia longa” não tenha um significado estritamente definido, é considerado para as lipases um comprimento de cadeia acilica com número maior ou igual a 10 átomos de carbono, sendo o triacilglicerol seu substrato padrão (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Ao se utilizar lipases como biocatalisadores é preciso levar em consideração algumas características de seu mecanismo de ação. Vários estudos têm revelado duas diferentes conformações das lipases (ERICSSON; KASRAYAN; JOHANSSON, 2008; SANDSTRON et al., 2012). Uma onde o acesso ao sítio ativo da enzima está fechado por um oligo-peptídeo hidrofóbico, chamado de *lid* ou tampa, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (lipase inativa) e a segunda conformação ocorre

quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa é deslocada, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio acessível. Ao mesmo tempo, a enzima expõe uma larga superfície de caráter hidrofóbico, o que facilita sua ligação à interface. Nesta conformação a lipase é considerada ativa. Este fenômeno é conhecido como “ativação interfacial” (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005). Logo as lipases preferencialmente atuam em interfaces água-óleo ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As lipases são enzimas de grande importância fisiológica na metabolização de lipídeos, e possuem considerável potencial industrial em diversos setores da economia (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As enzimas lipolíticas estão atraindo grande atenção devido ao seu potencial biotecnológico. Aplicações promissoras de lipase são encontradas em processos orgânicos, formulação de detergentes, sínteses de biosurfactantes, indústrias oleoquímica, indústria de laticínios, indústria agroquímica, manufatura de papel, indústrias de nutrição, cosméticos e processos farmacêuticos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As lipases podem ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, mas a maioria das lipases usadas em aplicações biotecnológicas é de origem microbiana, extraídas de fungos e bactérias, devido a enorme versatilidade desses micro-organismos e maior estabilidade das lipases obtidas (ARPIGNY; JAEGER, 1999; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Diversos pesquisadores têm realizado o isolamento e seleção de micro-organismos produtores de lipases das mais variadas fontes, dentre bactérias, fungos e leveduras (GONÇALVES, 2007).

Há uma diversidade de lipases que vêm sendo produzidas por cultura submersa ou métodos de fermentação no estado sólido usando várias espécies de micro-organismos, tais como as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, leveduras como *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Tulopsis* sp. e lipases bacterianas como as de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

#### 4.4. *Proteases*

As proteases podem ser conhecidas como proteinases, enzimas proteolíticas ou simplesmente peptidases, nome este que é sugerido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, Comitê de Classificação de Enzimas (RAWLINGNS; BARRETT; BATEMAN, 2011).

De acordo com este Comitê, as proteases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e a subclasse 4 (peptidases). As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases e a sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura (VERMELHO et al., 2008). Dessa maneira as enzimas proteolíticas podem ser subdivididas em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sitio de ação, ou seja, clivando peptídeos terminais (C- e N-terminal) ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente (RAO et al, 1998).

As proteases ainda podem ser divididas conforme seus resíduos nos centros catalíticos em seis classes principais: as aspartil proteases, serino proteases, treonino proteases, cisteíno proteases, glutamil proteases e metalo proteases (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006).

Enzimas proteolíticas desempenham um papel importante no metabolismo de quase todos os organismos (plantas, animais, fungos, bactérias e vírus). Elas executam uma variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir de sua ocorrência em todos os organismos. Essas proteínas tem papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, como catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, crescimento e migração celular, crescimento de tumores e metástases e transporte e secreção de proteínas através da membrana. (RAO et al.; 1998)

As enzimas proteolíticas foram as primeiras com aplicação tecnológica, pois já na antiguidade as proteases foram utilizadas na preparação de queijos e no tratamento de couros (VERMELHO et al.; 2008). As proteases tiveram sua aplicação ampliada como catalisadores industriais nos últimos anos por oferecerem diversas vantagens em detrimento dos catalisadores químicos convencionais. Dentre as características vantajosas que apresentam encontram-se: a alta atividade catalítica, alto grau de especificidade pelo substrato, podem ser

produzidas em larga escala, são economicamente viáveis e biodegradáveis, reduzindo assim, também a poluição ambiental (ESPÓSITO, 2006).

As plantas, os animais e os micro-organismos são as principais fontes de obtenção de enzimas proteolíticas. As proteases originárias de plantas são dependentes de alguns fatores, como a disponibilidade de uma grande área para cultivo e as condições climáticas para o ótimo crescimento. Além disto, o processo de obtenção é bastante demorado devido ao período de espera para o total desenvolvimento de uma planta sadia. Em contrapartida as proteases originárias de animais são preparadas em grandes quantidades. Sua produção geralmente depende da disponibilidade de gado para o abate, o que acaba tornando o processo bastante laborioso (RAO et al., 1998).

As proteases representam cerca de 60% do mercado industrial de enzimas, sendo extensamente usadas na indústria de detergentes, de cervejas, de couros, farmacêutica e alimentícia como, por exemplo, na coagulação do leite para produção de queijo. Proteases microbianas, principalmente fúngicas apresentam vantagens como a fácil obtenção e recuperação (KUMAR et al., 2005). A demanda industrial por enzimas proteolíticas que apresentem estabilidade e especificidade a fatores como: pH, temperatura, íons metálicos, surfactantes e solventes orgânicos; estimula a busca por novas enzimas (KAMOUN et al., 2008).

As proteases microbianas podem ser produzidas a partir de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, utilizando processos de fermentação em estado sólido e submersa, sendo este último o principal processo industrial de produção em larga escala das proteases (KAUR et al., 2001).

O interesse na produção de peptidases, em altas concentrações e baixo custo, é devido a sua grande importância no mercado mundial de enzimas e também a sua ampla aplicabilidade (Tabela 3).

**Tabela 3.** Aplicações industriais das proteases obtidas por micro-organismos, suas aplicações e estudos onde foram utilizadas.

Setor	Proteases	Micro-organismos	Possíveis aplicações	Fonte
Indústria farmacêutica	Colagenases	<i>Aspergillus niger</i> LCF9.	Agentes imunoterapêuticos, remoção de manchas e queloides, tratamentos de queimaduras e úlcera.	KUMAR; TAKAGI, 1999. SUKHOSYROVA et al., 2003.
	Queratinases	-	Remoção de calosidade humana, tratamento da acne, psoríase e micoses causadas por fungos dermatófitos.	BON; VERMELHO, 2004.
	Elastases	<i>Bacillus subtilis</i> 316 M.	Tratamento de queimaduras purulentas, edemas, furúnculos e abscessos profundos.	KUMAR; TAKAGI, 1999.
Indústria cosmética	Colagenases Queratinases	-	Crems esfoliantes e pomadas.	GUPTA et al., 2002.
Indústria de Saneantes	Proteases em geral	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Graphium putredinis</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> .	Remoção de resíduos de alimentos, sangue, secreções corporais.	RAO et al., 1998; SAVITHA et al., 2011.
Indústria do Couro	Queratinases	<i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> .	Redução da poluição ambiental e melhoria da qualidade do couro.	RAI; MUKHERJEE, 2009. VERMA et al., 2011;
Indústria de Alimentos	Proteases em geral	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrólise limitada do glúten para melhoramento no preparo de massa de pão, produção de queijos a partir da coagulação do leite.	RAO et al., 1998.

Diante das inúmeras vantagens do uso das enzimas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de promover a busca de novas enzimas, e viabilizar o processo de produção destas em escala industrial, principalmente no que diz respeito ao custo de sua aplicação.

Assim, o estudo utilizando a bioprospecção, e bactérias produtoras de enzimas isoladas do solo do Cerrado, permite o acesso a biodiversidade deste bioma, sendo uma abordagem que poderá fornecer dados biológicos e bioquímicos importantes para futuras aplicações nas diversas áreas da biotecnologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 1-8, 2002.

ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation on lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1380-1385, 2007.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Sreening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

ANDRADE, L. H.; PIOVAN, L.; PASQUINI, M. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as co-solvent. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, p. 1521-1525, 2009.

ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type i secretion system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2804-2817, 2006.

AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial - Biotecnologia na Produção de Alimentos**, v. 4. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001, 523 p.

ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Journal of Biosciences**, v. 23, n. 3. p. 66-75, 2007.

ARPIGNY, J. K.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and proprieties. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 177-183, 1999.

AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospeção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. n. 17, p. 1-37, 2013.

BALOTA, E.B.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 15-20, 2003.

BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 397-405, 2004.

BEDDINGTON, J. Food security, contributions from Science to a new and greener revolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 61-71, 2010.

BISPO, A. S. R. **Bioprospeção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. 2010. 107f. Tese (dissertação de mestrado em microbiologia agrícola) - Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 2010.

- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.
- BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.
- BRACKIN, R.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 57, p. 68-77, v. 2013.
- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 137-152, 2000.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and enzyme technology**. 2º ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2005. 626p.
- BULL A. T; WARD A. C.; GOODFELLOW M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 2000. 752 p.
- CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de enzimas para modificação de fibras sintéticas**. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fabricação) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal. 2003.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; MARTINS DA SILVA, D. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRUGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.
- CHAER, G.; FERNANDES, M.; MYROLD, D.; BOTTOMLEY, P. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. **Microbial Ecology**, v. 8, n. 2, p. 414-424, 2009.
- COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 302-307, 1997.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DEDEURWAERDERE, T. From bioprospecting to reflexive governance. **Ecological Economics**, v. 53, p. 473-491, 2005.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.

ESASHI, Y. Ethylene and seed germination. In: MATOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (ed.) **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC PRESS, 1991. p. 133-157.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó**. 2006, 98 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006, 602p.

FOCUS ON CATALYSTS. **Global industrial enzymes market: a comprehensive analysis** v. 2011, p. 1-2, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1351418010705146>>. Acesso em: 05 jun. 2015

GARG, S. K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutriente release by *Azotobacter* strains in aquatic system. **Bioresource Technology**, v. 80, p. 101-109, 2001.

GOMES, E. A.; SILVA, U. C.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de ferro *in vitro* por bactérias e fungos do solo In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, XXVII, 2010. Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. 1 CD.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007, 67f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.

GUCKER, B.; BOECHAT, I. G.; GIANI, A. Impacts of agricultural land use on ecosystem structure and whole-stream metabolism of tropical Cerrado streams. **Freshwater Biology**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 2069-2085, 2009.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n.1, p. 83-93, 2002.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, R.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25-36, 2000.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; E. L. J. VAN RENSBURG.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-85, 1998.

ILLMER, P.; SHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 389-395, 1992.

ISHERWOOD, K. F. **Mineral fertilizer use and the environment**. International Fertilizer Industry Association / United Nations Environment Programme, 2000.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JARVIS, M. Cellulose Stacks up. **Nature**, v. 426, n. 6967, p.611-612, 2003.

KAMOUN, A. S.; HADDAR, A.; ALI, N. E. H.; FRIKHA, B. G.; KANOUN S.; NASRI, M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**. v. 163, p. 299-306, 2008.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KAUR, S.; VOHRA, R. M.; BEG, Q. K.; HOONDAL, G. S. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 17, p. 125-129, 2001.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 63-67, 1997.

KIM, B. K.; LEE, B. H.; LEE, J. Y.; JIN, H. I.; CHUNG, C. H.; LEE, J. W. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6-7, p. 411-416, 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. **Microbial genetic resources and Biodiscovery**. Oxford, UK: WFCF Publishing, 2004. 400p.

- LEE, S. M.; KOO, Y. M. Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 11, p. 229-233, 2001.
- LEE, Y. J.; KIM, B. K.; LEE, B. H.; JO, K. I.; LEE, N. K.; CHUNG, C. H.; LEE, Y. C.; LEE, J. W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 378-386, 2008.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.
- LIAN, B.; WANG, B.; PAN, M. LIU, C.; TENG, H. H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, p. 87-98, 2008.
- LIN, T. F.; HUANG, H.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Tecnology**, v. 97, p. 957-960, 2006.
- LOPES, F. M.; RODRIGUEZ, A. G.; PEREIRA-JÚNIOR, M. A.; OLIVEIRA, F. A.; FERNANDES, K. F. Microbiologia Industrial - Aplicações Tecnológicas de Biorreatores na Produção de Biossurfactantes e Biofertilizantes. In: OLIVEIRA, S. S. (Org). **Ciências Moleculares**: Volume 2. Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2012. p. 116-149.
- LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA , M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 794–800, 2007.
- LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution, **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 5, p. 493-512, 2007.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose degradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.1, n. 2, p. 105-114, 2002.
- MANSFIELD, S.D; MEDER, R. Cellulose Hydrolysis – the Role of Monocomponent Cellulases in Crystalline Cellulose Degradation. **Cellulose**, v. 10, p. 159-169, 2003.
- MARGALEF, R. Temporal succession, In: POUZZA, T.; TRAVERS, M. **Perspective in marine biology Berkeley**. University of California (eds.). 1958. p. 323-347.
- MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 177-187, 2000.
- MENDONCA, R. C.; FEFILII, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do

bioma cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, 1279 p.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, n.16, p. 61-138, 2000.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

ODUM, E. P. Populações em comunidades. In ODUM, E. P., (Eds.), **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Guanabara, 1988. p. 258-272.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, K. F.; MALAVOLTA, L.; SOUZA, C. S.; VICENTE, E. J.; LALUCE, C. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 633-640, 2006.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 211-218, 1998.

PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; ROSADO, A. S. Decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie Van Leeuwenhoek, Dordrecht**, v. 98, n. 3, p. 403-413, 2010.

PIMENTA, R. S.; ALVES, P. D. D.; ALMEIDA, G. M. F.; SILVA, J. F. M.; MORAIS, P. B.; JÚNIOR, A. C.; ROSA, C. A. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 90-95, 2009.

POLITZER, K; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais - Visão geral e área de enzimas, conclusões e recomendações**. CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of oxidant and detergent-stable alkaline  $\beta$ -keratinase from *Brevibacillus* sp. Strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 47-56, 2011.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 23-27, 2002.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 38321-39328, 2011.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database, **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 270-272, 2006.

ROBOSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 10, p. 626-644, 1989.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PÉRA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J.; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. **PNAS - Exploring Copper Compounds**, v. 3, p. 78-83, 2012.

SANTOS, C. R., **Expressão, purificação e ensaios de cristalização de celulases fúngicas**. Campinas: Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, 2011.

SAVITHA, S.; SADHASIVAN, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 8, p. 179-192.

SCHUNMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; SMITH, F. W.; DELHAIZE, E. Characterization of promoter expression patterns derived from Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 398, p. 855-865, 2004.

SELVARAJ, P.; MADHAIYAN, M. SA, T. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 773-777, 2008.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 25, p. 91-98, 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHANMUGHAPRIYA, S.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RANI, C. Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulose from sponge-associated *Marinobacter* sp.MSI032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 625-640, 2010.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. **University Illinois Press**, Urbana, 1949.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA, N. D. **Identificação de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato e Análise do seu Efeito Sobre o Desenvolvimento de Plantas de *Arabidopsis thaliana***. 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, 2012.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 147-168.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 98-102, 2009.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2 ed. London: Elsevier Science, 1995. 357 p.

STURSA, P.; UHLIK, O.; KURZAWOVÁ, V.; KOUBEK, J.; LONESCU, M.; STOHALM, M.; LOVECKÁ, P.; MACEK, T.; MACKOVÁ, M. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant soil and Environment**, v. 55, n. 9, p. 389-396, 2009.

SUKHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B.; VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete

fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447-451, 2003.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial Cellulases-Production, Applications and Challagens. **Journal of scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

TAHA, M.; MAHMOUD, A. Z.; EL-DAMATY, A. H.; EL-HAFEZ, A. M. A. Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soil. **Plant and Soil**, v. 1, p. 149-160, 1969.

TAKAHASHI, S. ANWAR, M. R. Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to an andosol. **Field Crops Research**, v. 101, n. 2, p. 160-171, 2007.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHO, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. **Sustainable management of soil organic matter**, Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Editora ARTMED 6 ed. cap. 27, p. 714-731, 2003.

TORSVIK, V. OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TROLOVE, S. N.; HEDLEY, M. J.; KIRK, G. J. D.; BOLAN, N. S.; LOGANATHAN, P. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. **Journal of Soil Research**, v. 41, n. 3, p. 471-499, 2003.

VANCE, C. P.; UHDE S. C.; ALLAN D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytol**, v. 157, p. 423-447, 2003.

VERMA, A.; PAL, H. S.; SINGH, R.; AGARWAL, S. Potential of alkaline protease isolated from *Thermoactinomyces* sp. RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process. **International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 173-178, 2011.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, cap. 11, p. 273-283, 2008.

WANG, Y.; SHI, Y.; LI, B.; SHAN, C.; IBRAHIM, M.; JABEEN, A.; XIE, G.; SUN, G. Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 21, p. 4567-4573, 2012.

WHITMAN, W. B; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The Unseen majority. **Proceedings of the National Academy Sciences**, n. 95, p. 6578-6583, 1998.

YINGHUA , X.; JIAN, S.; QING, L.; JING, M.; YINGWU, S.; KAIL, L. Effects of a surface wildfire on soil nutrient and microbial functional diversity in a shrubbery. **Acta Ecologica Sinica**, v. 32, p. 258–264, 2012.

YU, X; AI, C.; XIN, L; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium Wilt and Promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138-145, 2011.

ZENG, Q.; LUO, F.; ZHANG, Z.; YAN, R.; ZHU, D. Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from dongxian wild rice species promotes cultivated rice growth. **Applied Mechanics and Materials**, v. 108, p. 167-175, 2012.

ZHANG, B.; DENG, H.; WANG, H.L.; YIN, R.; HALLETT, P.D.; GRIFFITHS, B.S.; DANIELL, T.J. Does microbial habitat or community structure drive the functional resilience of microbes to stress in severely degraded soils restored with different plant species? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 850-859, 2010.

ZHANG, C.; KE, S.; WANG, J.; GE, Y.; CHANG, S.X.; ZHU, S.; CHANG, J. Responses of microbial activity and community metabolic profiles to plant functional group diversity in a full-scale constructed wetland, **Geoderma**, v. 160, p. 503–508, 2011.

ZHAO, Y.; LI, J.; WANG, Z.; YAN, C.; WANG, S.; ZHANG, J. Influence of the plant development on microbial diversity of vertical-flow constructed wetlands. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 4–12, 2012.

## OBJETIVOS

### *Objetivos Gerais*

- Isolar, caracterizar e selecionar bactérias produtoras de enzimas bem como avaliar a diversidade bacteriana em solo do Cerrado do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET/UEG.
- Caracterizar a produção de protease e identificar bactérias isoladas do solo do Cerrado do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET/UEG, em dois meios de cultivo.

### *Objetivos Específicos*

#### *Capítulo 1*

- Realizar a análise físico-química do solo do Cerrado do CCET/UEG;
- Promover a contagem de bactérias viáveis do solo do Cerrado do CCET/UEG;
- Isolar e selecionar bactérias produtoras de lipases, celulases, proteases e solubilizadoras de fosfato do solo do Cerrado do CCET/UEG, em meios semi-seletivos;
- Realizar a caracterização morfológica das bactérias isoladas do solo do Cerrado do CCET/UEG;
- Testar a atividade enzimática por análise semi-quantitativa para as enzimas lipases, celulases, proteases e de solubilização de fosfato para as bactérias isoladas selecionadas nas etapas anteriores;
- Analisar a similaridade das bactérias selecionadas utilizando os dados morfológicos e bioquímicos;
- Calcular o índice de diversidade das bactérias cultiváveis selecionadas da amostra de solo do Cerrado do CCET/UEG.

#### *Capítulo 2*

- Seleção de bactérias isoladas do solo do Cerrado do CCET/UEG com alta produção de protease;

- Avaliar o crescimento e a produção de proteínas totais das bactérias selecionadas em caldo nutriente e caldo leite;
- Analisar o perfil proteico em gel de eletroforese SDS-PAGE das amostras cultivadas em caldo leite e caldo nutriente;
- Determinar a atividade proteolítica das enzimas exudadas pelas bactérias selecionadas no caldo leite.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Enzimas de origem microbiana são utilizadas em vários setores industriais sendo que o mercado mundial destes produtos alcançou U\$ 50 bilhões em 2009 e há a estimativa de alcançar U\$ 70 bilhões em 2015. O grande desafio do setor industrial reside na substituição de tecnologias convencionais por processos mais sustentáveis gerando produtos mais eficientes e competitivos economicamente. Assim, as enzimas microbianas têm se mostrado uma alternativa viável e vêm ganhando mercado, substituindo a catálise química convencional em muitos processos industriais (VERMELHO et al., 2013).

Atualmente o Brasil importa cerca de 95% do total de enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras. Sua participação no desenvolvimento da tecnologia enzimática nacional ainda é incipiente, com menos de 2%. Assim, há uma demanda de fontes biológicas que possam produzir enzimas como as proteases, celulase e lipases, para serem utilizadas no desenvolvimento de tecnologia nacional, diminuindo assim, a dependência do país em relação a empresas multinacionais de biotecnologia neste setor (RAO et al., 1998).

Aproximadamente 90% das enzimas aplicadas industrialmente são de origem microbiana (GODFREY; WEST, 1996), e as enzimas mais empregadas são as enzimas da classe das hidrolases extracelulares como proteases, celulases, lipases e amilases (OLIVEIRA, A. et. al., 2006). Esta classe de enzimas apresenta vantagens por não serem dependentes de cofatores para sua atividade, permitindo sua aplicação em grande variedade de condições (QUAX, 2013). Por isso, vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos, no tratamento de resíduos, nas indústrias têxteis, de detergentes, alimentícia, de papel, e de couro (ITOH et al., 1990; NIELSEN; OXENBOLL, 1998; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Devido à sua vasta aplicação nesses setores industriais, assim como no campo farmacêutico, as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases (OLIVEIRA A., et. al., 2006). Já as amilases, lipases e celulases, comumente utilizadas na indústria de amido, detergente e têxtil, representam o segundo maior grupo de enzimas (GHORBEL; KAMOUN; NASRI, 2003).

As bactérias participantes do processo de solubilização de fosfato inorgânico podem atuar de dois modos principais: por exudação de enzimas ou de compostos que atuem na liberação do fosfato ligado (BARROSO, 2006). Assim, há uma demanda no isolamento e identificação de micro-organismos com esta capacidade, para serem utilizadas na agricultura como biofertilizantes através da inoculação de sementes bem como na biorremediação de fosfato em solos e águas (DE-POLLI, et al., 1996).

Os micro-organismos do solo representam uma excelente fonte de enzimas devido a sua ampla diversidade bioquímica, por apresentarem rápido crescimento e pelo fato de que em geral, seus substratos para crescimento são relativamente baratos (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; YU; CHOU, 2005). As bactérias têm sido amplamente empregadas como produtoras de diferentes substâncias de interesse econômico como as enzimas. Geralmente as enzimas produzidas pelas bactérias são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação (GERMANO et al., 2003).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (MANFIO; LEMOS, 2003). Apesar disso, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas é de interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES, et al., 2002).

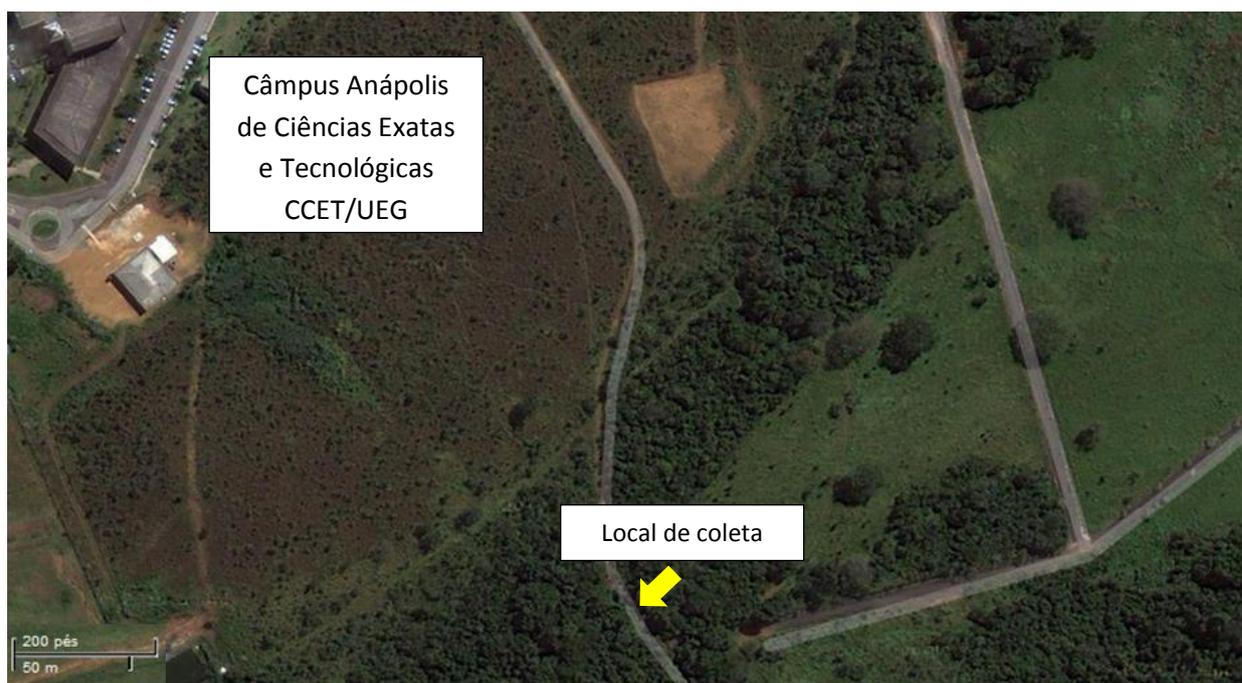
Neste trabalho foram isoladas, caracterizadas e selecionadas bactérias produtoras das enzimas proteases, lipases e celulasas, e ainda bactérias solubilizadoras de fosfato, sendo também determinada a similaridades entre as bactérias e sua diversidade em solo de Cerrado do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET/UEG. Esta é a etapa inicial para identificação de bactérias promissoras para serem utilizadas como novos recursos biotecnológicos oriundos da biodiversidade do solo do Cerrado goiano.

## METODOLOGIA

### 1. Coleta do solo.

Em outubro de 2013, o material de estudo foi coletado na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás - CCET/UEG no município de Anápolis - Goiás (Latitude:  $-16^{\circ} 23' 0.4194''$  Longitude:  $-48^{\circ} 56' 37.7874''$ ) (Figura 2). Foram coletadas 200 g de solo em cinco pontos distintos de uma região de 5 m<sup>2</sup> a partir dos primeiros 10 cm da superfície do solo. Posteriormente essas foram transferidas para um frasco estéril (*pool* das amostras) e foram acondicionadas a 4 °C seguindo metodologia descrita por Castilho et al. (2006), a metade das amostras foram utilizadas nas análises físico-químicas e a outra metade para as análises microbiológicas.

**Figura 2.** Imagem de satélite do local de amostragem do solo.



Fonte: Google Earth - Maps, 2013 Adaptado.

### 2. Análise físico-química do solo.

Após serem secas e peneiradas, as amostras de solo foram analisadas no Laboratório Solocria Análises de Solo - Goiânia - GO, para determinação do conteúdo de carbono (C), boro (B), enxofre (S), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al), potássio (K), alumínio + hidrogênio (H + Al), fósforo (P), nitrogênio (N) determinação do pH, teor de matéria orgânica (M.O.), soma das bases

intercambiáveis, capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (C.T.C.), porcentagem de saturação por bases (V%) e a textura do solo a partir da análise granulométrica (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise Físico-química do solo coletado na reserva ecológica do CCET/UEG.

Identificação da amostra	pH	Ca	Mg	Al	H + Al	K	P	K	Cu	Zn	Fe	Mn	B	Na	S
	CaCl <sub>2</sub>	-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				-----mg/dm <sup>3</sup> -----									
	5,1	5,9	1,6	0,1	4,5	0,2	3,0	79	1,1	4,1	15,2	30,2	0,2	12,0	8,7
Pool das Amostras	Soma das Bases	C.T.C. pH 7,0		Sat. Bases (V%)		N	C	M.O.	Granulometria						
	-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			%		%	---g/dm <sup>3</sup> ---	Argila g/kg	Silte g/kg	Areia g/kg					
	7,7	12,2		63,1		0,4	41,8	72,0	280	80	640				

Alumínio (Al), boro (B), cálcio (Ca), carbono (C), Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (C.T.C.), cobre (Cu), enxofre (S), ferro (Fe), fósforo (P), hidrogênio + alumínio (H + Al), magnésio (Mg), manganês (Mn), matéria orgânica (M.O.), nitrogênio (N), porcentagem de saturação por bases (V%), potássio (K), potencial hidrogeniônico (pH), sódio (Na), zinco (Zn).

### 3. Contagem e detecção de bactérias com potencial biotecnológico.

A contagem do número de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC) presentes no solo coletado e a detecção de bactérias com potencial biotecnológico foi determinada pela metodologia descrita por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). Das amostras de solo (*pool* das 5 amostras coletadas) foram pesados 10 g do solo que em seguida foram adicionados em um Erlenmeyer estéril de 250 mL com 90 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizados em mesa agitadora (TE-4200, Tecnal<sup>®</sup>) do tipo “shaker” a 150 rpm por 30 minutos. A partir dessa mistura (solo + solução salina) foi retirada 1 mL para a realização das diluições seriadas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup> em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril. Uma alíquota de 100 µL foi retirada dos tubos de diluição seriada e foi inoculada em placas de Petri com meio nutriente sólido (para contagem de bactérias totais viáveis), BDAact (batata dextrose ágar - para contagem de Actinomicetos), meio leite sólido (para detecção de bactérias produtoras de proteases), meio tween sólido (para detecção de bactérias produtoras de lipases) e meio Pikovskaya’s sólido, para detecção de bactérias solubilizadoras de fosfato insolúvel. As composições dos diferentes meios de cultura utilizados estão descritos no Anexo. As placas inoculadas como as amostras foram incubadas em câmara de germinação (TE-401, Tecnal<sup>®</sup>) a 30 °C por um período de 72 horas.

A inibição de crescimento de fungos nos meios de contagem de bactérias, foi dada através da adição de 150 µL de cetoconazol (20 mg mL<sup>-1</sup>) para cada 100 mL de meio de

cultura.

A contagem das colônias foi feita a cada 24 horas de incubação utilizando o contador de colônias CP 600 Plus (Phoenix Luferco), juntamente com a observação da presença de halos nos meios de detecção de enzimas e solubilização de fosfato. A quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinada segundo Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

#### 4. Seleção, purificação e manutenção das bactérias.

A partir das placas de contagem foram selecionadas as colônias de bactérias que apresentarem halos enzimáticos (produção de enzimas), halos de solubilização de fosfato e as bactérias que apresentaram características macroscópicas singulares. Das colônias selecionadas foi realizada uma etapa de isolamento e purificação por meio da técnica de esgotamento com alça de platina em placas contendo os meios de origem descritos acima.

As bactérias isoladas foram incubadas em 10 mL de meio caldo nutriente (Anexo) em mesa agitadora tipo *shaker* a 150 rpm por 48 horas a 30 °C. Após o período de incubação as culturas foram centrifugadas (minispin plus Eppendorf®) em microtubos a 13.000 rpm por 2 minutos, seguida do descarte do sobrenadante e com o acréscimo de glicerol (30%) estéril sendo armazenadas em *freezer* a -80 °C (MDF-U56VC, Sayno®), para posterior utilização.

#### 5. Caracterização morfológica das colônias isoladas.

A análise foi conduzida quanto às características das colônias em placa de Petri com ágar nutriente (Anexo) por 72 horas a 30 °C, conforme Hungria e Silva (2011). Os aspectos considerados foram: velocidade do crescimento (muito rápido – menor que 24 horas – ou rápido – entre 1 a 3 dias); tamanho (diâmetro das colônias classificadas em pequenas – menor que 2 mm, médias – maior ou igual a 2 mm e menor que 3 mm, e grandes – maior ou igual a 3 mm); forma (puntiforme, circular ou irregular); elevação (plana, lenticular ou convexa); borda (plana, ondulada ou denteada); superfície (lisa, rugosa ou papilada); produção de muco (escassa, pouca, moderada ou abundante); consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, elástica, butírica); detalhes ópticos (transparente, translúcido, opaco) e pigmentação da colônia (creme, alaranjado, amarelo e rosa).

#### *6. Teste de atividade enzimática e de solubilização de fosfato inorgânico.*

Os testes enzimáticos foram realizados segundo a metodologia descrita por Dingle; Reid; Salomons (1953) modificada. Os isolados com potencial de produção de enzimas e de solubilização de fosfato que foram selecionados previamente no teste de detecção de bactérias com potencial biotecnológico foram inoculados nos meios de indução com a finalidade de estimular a produção de enzimas e realizar a solubilização de fosfato inorgânico. Os isolados selecionados foram testados individualmente em todos os meios semi-seletivos para a detecção da secreção de enzimas (proteases, celulasas e lipases) e para solubilização de fosfato inorgânico.

Os meios sólidos utilizados para avaliação da produção enzimática foram: meio leite (proteases), meio CMC (celulasas) e tween (lipases) estes foram ajustados para pH 7,0 (Anexo). Para a solubilização de fosfato foi utilizado os meios Pikovskaya's (PIKOVSKAYA, 1948) e NBRI-P (NAUTIYAL, 1999), ambos ajustados para pH 7,0 (Anexo).

Foram empregados 20  $\mu$ L das culturas bacterianas crescidas por 24 horas em meio nutriente líquido sob agitação a 150 rpm e temperatura de 30 °C para todos os testes.

A formação de um halo claro ao redor das colônias, foi observada e avaliada com 5 dias para o meio contendo tween 80, 3 dias para os meios contendo leite desnatado, 7 dias para o meio contendo carboximetilcelulose e para o meio Pikovskaya's e com 15 dias para o meio NBRI-P.

Foram feitas as avaliações dos halos pela medida do diâmetro da colônia e do halo com paquímetro em milímetros (Vernier Caliper® 150 x 0,05 mm). Foram calculados os índices de solubilização (IS) e índice enzimático (IE) utilizado a razão entre as medidas dos diâmetros das colônias sobre as dos halos observados para cada isolado (HANKIN, ANAGNOSTAKIS, 1975). As bactérias que não formaram halo foram consideradas negativas para os testes. Desta forma, aqueles isolados que apresentarem um índice de solubilidade maior possui consequentemente uma atividade enzimática elevada no meio avaliado. Com base nesses índices, as bactérias foram classificadas como estirpes com baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS < 4$ ) e alta solubilização ( $IS > 4$ ) para os testes de solubilização de fosfato inorgânico (HARA; OLIVEIRA, 2005). Já para os testes de degradação de proteínas, lipídios e

carboximetilcelulose foram considerados como bons degradadores os que apresentaram índice enzimático (IE)  $\geq 2$  (LEALEM; GASHE, 1994).

Para uma melhor visualização dos halos de celulasas utilizou-se a técnica de revelação por vermelho congo 0,1%, seguida da lavagem com NaCl 1 mol L<sup>-1</sup> (TEATHER; WOOD, 1982). A visualização dos halos de lipase foi melhorada após armazenar as placas por 48 horas em geladeira a 4 °C evidenciando assim a presença de cristais de sais de cálcio do ácido láurico, liberados ao redor das colônias, formando um halo (ANDERSON, 1939).

#### 7. *Teste de capacidade de crescimento em meio livre de nitrogênio.*

Este teste é relacionado à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico pelas bactérias em meio de cultura livre deste nutriente (TEIXEIRA; MELO; VIEIRA, 2005). As colônias foram inoculadas em caldo nutriente, incubadas em agitador a 150 rpm, a 30 °C por 24 horas. Após apresentarem crescimento positivo, 20 µL foram inoculados em frascos ampola contendo aproximadamente 4 mL de meio de cultura semi-sólido NFB (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) livre de nitrogênio e o resultado foi observado em aproximadamente 48 horas. A formação de halo característico na superfície do meio de cultura foi indicativa de que as bactérias realizaram a FBN, e as bactérias que não apresentaram o halo característico foram consideradas negativas para esta característica (KUSS, et al., 2007)

#### 8. *Análise de dados*

Após a análise morfofisiológica dos isolados, foi construída uma matriz binária, com os dados obtidos das características morfológicas das colônias isoladas, da capacidade de produção de enzimas, de solubilização de fosfato e do crescimento em meio livre de nitrogênio. Foram atribuídos os valores numéricos quanto às características morfológicas e bioquímicas (enzimas), onde na presença de determinada característica foi atribuído o valor “1” e na sua ausência o valor “0”. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*). Os valores gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard, onde  $J = a/(n-d)$ , sendo “a” o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, “d” é o número de combinações de ausência de fragmentos e “n” é o número de combinações possíveis. Para estas análises foi utilizado o software NTSYSpc® (versão 2.02i, 1986-1998 Applied

Biostatistics) que gerou um dendrograma de similaridade entre as bactérias analisadas, permitindo avaliar a diversidade dos isolados (ROHLF, 1992). A partir da construção do dendrograma, foram determinados grupos, e estes foram considerados como unidades taxonômicas operacionais (OTU).

#### *9. Avaliação da diversidade pelo índice de Shannon-Weaver.*

A partir da análise dos dados obtidos no dendrograma foi determinada a riqueza de espécies (S), representada pelo número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) constituídas por cada um dos agrupamentos a partir das características morfofisiológicas.

A diversidade de espécies foi avaliada utilizando o programa BioDiversity Pro ver. 2 (MCALEECE et al., 1997), mediante o cálculo do índice de Shannon-Weaver através da seguinte fórmula:

$$H' = \sum_{i=1}^{i=S} p_i \ln(p_i)$$

Onde: H' é o índice de diversidade de Shannon-Weaver e p<sub>i</sub> é o número de indivíduos de uma dada espécie, dividido pelo número total de espécies observadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *1. Análise físico-química do solo.*

As amostras de solo coletadas na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás - CCET/UEG apresentam uma textura média, ou seja, teor de argila inferior a 35% e um teor de areia superior a 15% (Tabela 4) (BATISTA; PAIVA; MARCOLINO, 2014). As amostras de solos da região coletada apresentam uma boa fertilidade, ou seja, eutrófico sendo a saturação de bases (V%) maior ou igual a 50%, além disso, foi observada uma baixa concentração de alumínio (Tabela 4).

A análise do pH na amostra (Tabela 4), apresentou em média valor de 5,1 sendo considerado um solo ácido estando de acordo com as características gerais dos solos de Cerrado (OLIVEIRA et al., 2005; EMBRAPA, 2006). Os solos são ácidos devido à pobreza de cátions básicos como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na) no material de origem ou a processos pedogenéticos que favorecem a perda dos mesmos. (RAIJ, 1991). Desta maneira, quanto menos a capacidade de troca de cátions for ocupada por cátions básicos, mais ácido será o solo (RAIJ, 1991).

A matéria orgânica do solo é resultante, em grande parte, da decomposição de resíduos de origem animal e principalmente vegetal, não tendo, portanto, relação com o material de origem do solo. Parte do carbono existente nos resíduos é liberada para a atmosfera na forma de dióxido de carbono e o restante passa a fazer parte da matéria orgânica como um componente do solo (SANTOS; CARMARGO, 1999).

De acordo com Cuevas e Medina (1986), a quantidade e a qualidade de nutrientes fornecidos ao solo pela deposição da serapilheira são variáveis, sendo dependente, principalmente, das espécies que compõem a formação florestal e da disponibilidade de nutrientes no solo. Nos fragmentos florestais a quantidade da serapilheira costuma ser maior quando se compara a fragmentos não florestais ou de menor densidade arbórea levando a um maior acúmulo de matéria orgânica na superfície (TOGNON; DEMATTÊ; DEMATTÊ, 1998).

O alto teor de matéria orgânica no solo coletado na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológica da Universidade Estadual de Goiás - CCET/UEG pode ser explicado pela deposição de serapilheira no período de coleta das amostras. Segundo

Rodrigues et al. (2000); Vital et al. (2004) e Silva et al. (2007) a maior produção de serapilheira registrada foi nos períodos de seca e de altas temperaturas.

De maneira geral os solos do Cerrado possuem baixas saturações por bases e altos teores de alumínio e algumas vezes de ferro e manganês, baixos teores de fósforo, cálcio e magnésio. Quase sempre apresentam solos deficientes em micronutrientes, principalmente zinco. São pobres em matéria orgânica com baixa capacidade de troca e saturação de bases (OLIVEIRA et al., 2005). Pelos dados obtidos o solo amostrado apresentou uma alta saturação de bases, baixa concentração de alumínio, alta concentração de micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) com exceção do boro que teve uma baixa concentração. Além disso apresentou alta concentração de matéria orgânica diferindo parcialmente do proposto por Oliveira et al. (2005).

## 2. Detecção e contagem de bactérias com potencial biotecnológico.

Pela contagem o número de bactérias viáveis da amostra coletada foi em média de  $9,2 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de solo. Já a contagem no meio seletivo para actinobactérias (BDAact) foi de  $7,7 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  e no meio de indução para produção de lipase (tween) foi de  $3,0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ . A contagem nos meios seletivos para detecção de bactérias produtoras de protease (meio leite) e para solubilização de fosfato (meio Pikovskaya's) foram respectivamente de 2,8 e  $1,4 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  (Tabela 5). Sendo que dos valores obtidos a maior contagem observada foi para o meio de lipase quando comparado com os demais meios específicos para a produção de enzimas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Contagem de bactérias nos diferentes meios de cultura a partir da amostra de solo coletada na reserva ecológica do CCET/UEG.

Meio de cultura	Contagem em 72 horas	
	UFC $g^{-1}$ *	Desv. pad.
NA	$9,2 \times 10^6$	1,25
BDAact	$7,7 \times 10^5$	5,41
Leite	$2,8 \times 10^6$	5,80
Tween 80	$3,0 \times 10^6$	3,70
Pikovskaya's	$1,4 \times 10^6$	4,76

\*Média das triplicatas, NA - Meio nutriente ágar, BDAact - Batata dextrose ágar para actinobactérias.

A contagem de micro-organismos do solo em placas de Petri mostra apenas uma parte da comunidade real existente neste ambiente, sendo considera a microbiota cultivável (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Devido ao fato de haver uma grande diversidade de micro-

organismos no solo, diferentes procedimentos podem ser utilizados para aperfeiçoar o crescimento microbiano e revelar maior número de espécies. Portanto, as condições de cultivo, como por exemplo, o meio de cultura, a temperatura e o período de incubação devem ser escolhidas com cuidado (SORHEIM; TORSVIK; GOKSOYR, 1989).

No trabalho de Andersen e Hirichsen (1995) foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias de solo em placas de Petri, utilizando o meio PCA (*plate count agar*), sendo incubadas por 5 dias a temperatura de 20 °C. Já Cattelan e Vidor (1990) empregaram a temperatura de 28 °C e o período de incubação de 7 dias em meio Thorton para também realizarem a contagem de UFC. Temperaturas mais elevadas, de 30 °C, foram utilizadas por Barroti e Nahas (2000), em meio Bunt & Rovira por um período de incubação de 24 horas e no trabalho de Pereira-Júnior (2013) o número de UFC foi determinado em meio nutriente ágar (NA) e incubado a 35 °C por 24 horas. Por não haver uma uniformidade dos parâmetros de contagem, neste trabalho foi utilizada uma condição intermediária sendo realizada em meio NA e temperatura de 30 °C por 72 horas, e os resultados obtidos não apresentaram grande variabilidade quanto a UFC observado em solos de Cerrado.

Melloni et al. (2001) avaliando as características biológicas de solos de mata ciliar e de campo de Cerrado, observaram que o número médio de propágulos viáveis por grama de solo seco foi de  $10^6$  a  $10^7$  para bactérias e  $10^4$  a  $10^5$  para micro-organismos solubilizadores de fosfato. Sendo que, pelas avaliações das contagens na amostra de solo da reserva ecológica da UEG, foram observados valores semelhantes para contagem de bactérias totais e micro-organismos solubilizadores de fosfato. Já para a contagem de actinobactérias os valores obtidos ( $10^5$  UFC  $g^{-1}$ ) foram semelhantes aos de Pereira e colaboradores (1999) em amostras de solo de Cerrado.

Arifuzzaman e colaboradores (2010) discutem que a concentração microbiana do solo varia com a localização geográfica, temperatura, tipo do solo, pH, concentração de matéria orgânica e umidade. Assim é possível que em um mesmo Bioma possa haver diferenças quanto ao número total de bactérias, como foi observado por Andrade e colaboradores (2010), que registraram a contagem de  $2,0 \times 10^5$  para bactérias totais em amostras de solo de uma região do Cerrado situado no Rio Paranaíba, MG. Sendo esta menor do que a obtida nas amostras avaliadas (Tabela 5)

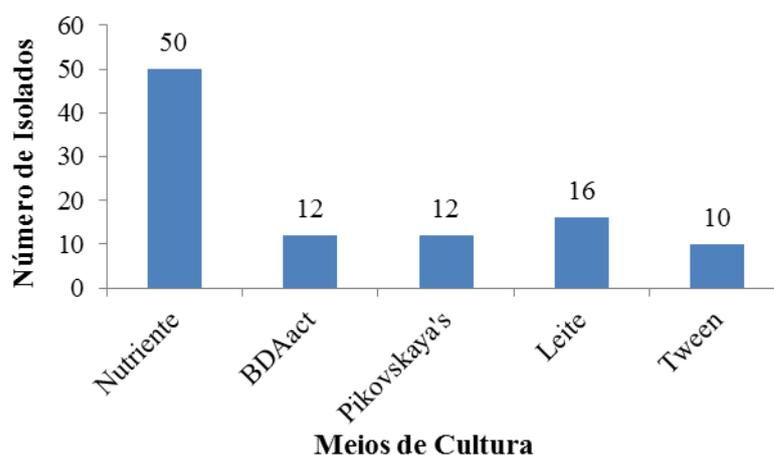
As populações de bactérias proteolíticas do solo retirado da reserva ecológica da UEG ficaram em torno de  $2,8 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ . Estes números são próximos aos obtidos por Nahas e Sanomiya (2003).

### 3. Isolamento, seleção e purificação das bactérias

A partir das contagens dos micro-organismos nos diferentes meios foram coletadas aleatoriamente as colônias bacterianas crescidas perfazendo um total de 100 isolados. Os isolados receberam um código seguido de uma numeração sequencial conforme a sua origem. Os isolados no meio nutriente foram nomeados com o prefixo ANA; os obtidos no meio leite ALT, no meio Pikovskaya's APK, no meio Tween ALI e no meio BDAact ACT. Todas as bactérias isoladas foram purificadas no meio de origem para evitar contaminação e a presença de mais de um organismo nas amostras, sendo utilizado método de esgotamento em placa.

Foram isoladas e purificadas em placas um total de 100 bactérias sendo 50 em ágar nutriente, 12 bactérias no meio BDAact, 16 bactérias no meio leite, 10 bactérias no meio Tween e 12 bactérias no meio Pikovskaya's (Figura 3).

**Figura 3.** Quantidade de bactérias isoladas do solo da reserva ecológica CCET/UEG por meio de cultura.



Diversos autores enfatizam que, embora os avanços nos campos da genética, fisiologia microbiana, biologia molecular e instrumentação tenham provocado grande impacto na produção de enzimas, a utilização de *screening* visando à seleção de micro-organismos com habilidade de produzir bioativos continua a ser uma importante metodologia. Portanto, a implementação de programas sistemáticos de *screening* de micro-organismos, orientados por alvos industriais bem definidos, possibilitaria novas oportunidades comerciais (STEELE;

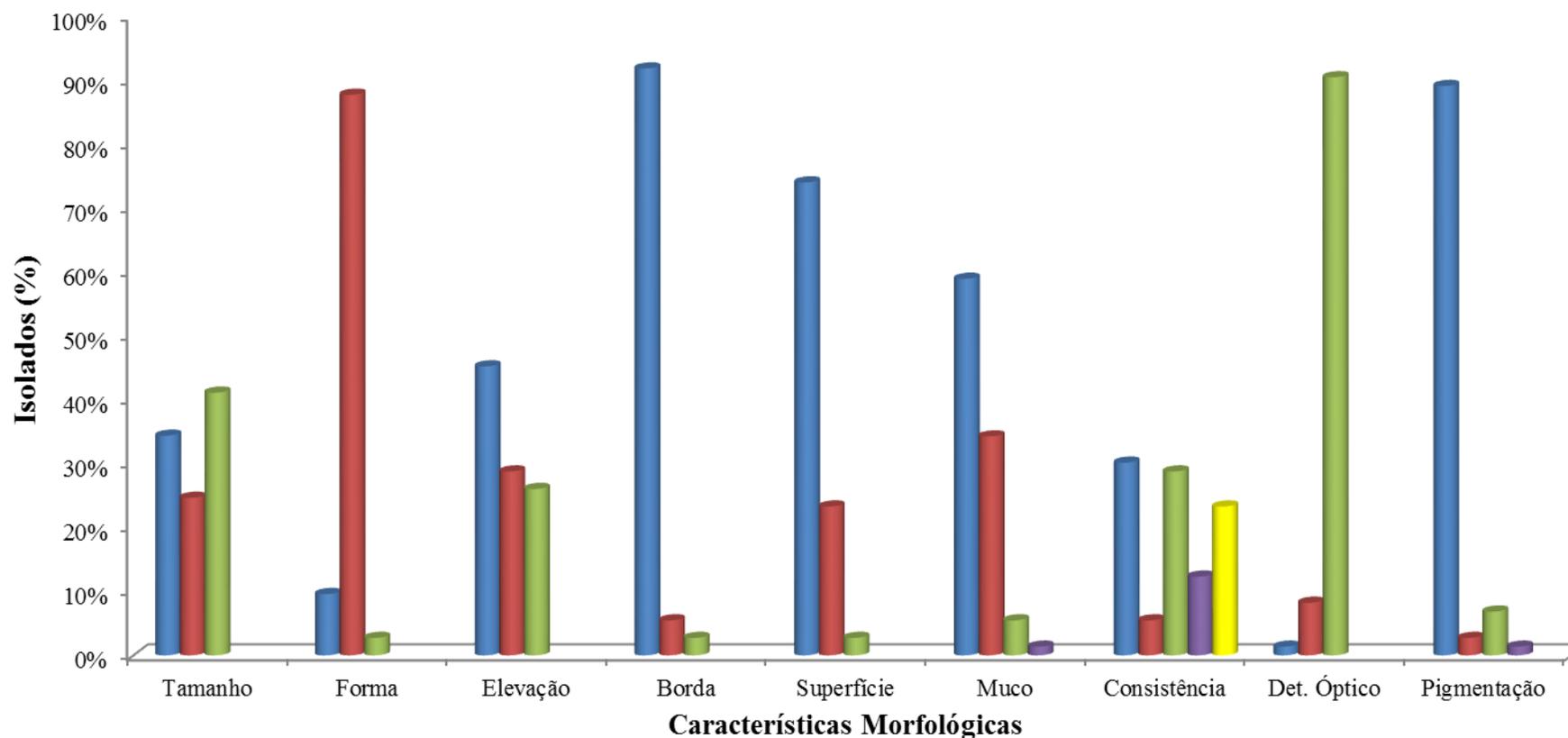
STOWERS, 1991; BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992; BUZZINI; MARTINI, 2002; OGAWA; SHIMIZU, 2002; RUIZ; PASTOR; DIAZ, 2005).

Utilizando as metodologias descritas foi possível estabelecer os alvos de estudo da comunidade da microbiota do solo do Cerrado da reserva ecológica CCET/UEG, utilizando o *screening* para a identificação e isolamento de bactérias com potencial de produção de enzimas. Esta abordagem permitiu a identificação posterior de isolados produtores de enzimas com potencial de utilização biotecnológica, indicando a efetividade da estratégia de estudo utilizada.

#### *4. Caracterização morfológica das colônias.*

Para as caracterizações morfológicas das colônias foram selecionados os isolados de crescimento rápido, pois o curto tempo de geração dos micro-organismos diminui o tempo de produção de enzimas, possibilitando sua produção em larga escala, portanto foram caracterizadas 73 bactérias que apresentaram esta característica, das 100 inicialmente isoladas. O critério de crescimento rápido foi estipulado para os isolados que apresentaram crescimento em até 72 horas (Figura 4 e Tabela 6 em anexo).

**Figura 4:** Representação porcentual das características morfológicas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em ágar nutriente a 30 °C, por 72 horas.



Tamanho – pequena: azul, médio: vermelho, grande: verde; Forma – puntiforme: azul, circular: vermelho, irregular: verde; Elevação – plana: azul, lenticular: vermelho, convexa: verde; Borda – plana: azul, ondulada: vermelho, denteada: verde; Superfície – lisa: azul, rugosa: vermelho, papilada: verde; Muco – pouca: azul, escassa: vermelho, moderada: verde, abundante: roxo; Consistência – seca: azul, aquosa: vermelho, gomosa: verde, viscosa: roxo, butírica: amarelo; Det. Óptico (Detalhe óptico) – transparente: azul, translúcido: vermelho, opaco: verde; Pigmentação – Creme: azul, alaranjado: vermelho, amarelo: verde, rosa: roxo.

Através da análise da morfologia das colônias (Figura 4 e em anexo na Tabela 6) foi observado que a produção de muco foi considerada como escassa (58,90%), pouca (34,25%), moderada (5,48%) ou abundante (1,37%). Já quanto a consistência foram observadas colônias gomosas (28,77%), aquosas (5,48%), viscosas (12,33%), butíricas (23,28%) ou secas (30,14%) (Figura 4 em anexo na Tabela 6). Os tamanhos das colônias foram variados, onde 34,36% dos isolados apresentaram diâmetros menores que 2 mm (pequeno), 24,65% com diâmetro maior ou igual a 2 mm e menor que 3 mm (médio) e 41,09% com diâmetro da colônia maior ou igual a 3 mm (grande) (Figura 4 em anexo na Tabela 6). A média geral dos diâmetros das colônias dos 73 isolados foi de 2,82 mm (Tabela 6 em Anexo).

Quanto à forma da colônia houve uma predominância da forma circular (87,67%), e pequena proporção de forma puntiforme (9,59%) sendo que somente duas colônias se apresentaram como irregular (2,74%). Pela avaliação da elevação 45,20% foram consideradas planas; 28,77% lenticulares e 26,03% convexas (Figura 4 em anexo na Tabela 6). Na observação das bordas a maioria apresentou bordas inteira ou plana (91,78%), e poucas foram consideradas ondulada (5,48%) ou denteada (2,74%). Quanto a superfície 73,97% foram lisas, 23,29% rugosas e 2,74% papiladas. Nos detalhes ópticos as formas observadas foram colônias opacas (90,40%), translúcidas (8,23%) e transparentes (1,37%) (Figura 4 em anexo na Tabela 6). Quanto a coloração (cromogênese/pigmentação) a maioria foi detectada como creme (89,04%) e 6,85% e 2,74% consideradas amareladas e alaranjadas, respectivamente. E apenas um isolado apresentou a coloração rósea para a colônia (1,37%) (Figura 4 em anexo na Tabela 6).

Dentre os isolados avaliados houve uma predominância de colônias gomosas, aquosas e viscosas, indicando que estes isolados produzem exopolissacarídeos variados, tanto na composição quanto na quantidade. As colônias que apresentaram superfície gomosa são aquelas capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS), fator importante para auxiliar e beneficiar a sobrevivência das bactérias em ambientes estressantes. Alguns autores afirmam que os EPS podem proteger as bactérias contra ataque de outros micro-organismos, como bacteriófagos ou protozoários, ou ainda, evitar desidratação das estruturas celulares devido a solos salinos (XAVIER et al., 1998, SUTHERLAND, 1998; RUAS-MADIEDO; REYES-GAVILÁN, 2005) ou em condições de temperatura elevada (OSA-AFIANA; ALEXANDER, 1982).

Para Martins et al. (1997) algumas características de colônias isoladas, como forma e consistência do muco, são dependentes do período de crescimento em que são realizadas as avaliações, sendo que quanto maior o tempo de incubação maior será a intensidade de produção dos exopolissacarídeos. Assim, foi estipulado para os isolados avaliados, o tempo de crescimento de três dias, pois neste período o desenvolvimento das colônias foi homogêneo em sua forma e características.

Sprent (1984) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, pois é uma estratégia que pode melhorar sua sobrevivência no solo. Estirpes de crescimento rápido tendem a produzir mais goma e colônias maiores, como as bactérias da família *Rhizobiaceae*. Já rizóbios de crescimento lento formam colônias secas ou com baixa produção de exopolissacarídeos (MARTINS et al., 1997). Levando em consideração tais afirmativas, alguns dos isolados constituem um grupo interessante, pois apresentam uma produção abundante de goma e crescimento rápido (Figura 4 em anexo na Tabela 6), características que favorecem a adaptação e competitividade dos isolados em solos de Cerrado.

Apesar da grande prevalência de coloração creme na análise morfológica das colônias, esta também revelou que alguns isolados apresentaram pigmentação mais escura (alaranjada e amarelada) que as demais. Estes resultados indicam que as bactérias estão produzindo pigmentos de tipos e com quantidades diferentes (Figura 4 em anexo na Tabela 6). A produção de pigmentos foi observada em vários gêneros de bactérias como *Corynebacterium* que apresenta uma coloração das colônias que pode variar de branca a amarela ou laranja (COLLINS; BRADBURY, 1984). Para Pereira e colaboradores (2003) bactérias com pigmentação amarelada são comuns no gênero *Xanthomonas*. Alguns autores citam ainda que a presença de pigmento possa ser utilizada para polimerizar moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos ou compostos reativos de oxigênio, agindo na detoxificação de compostos danosos para a bactéria (HYNES; KRUCKSCH; PRIEFER; 1988; FRIZZO, 2007). Estudos recentes indicam que a produção de pigmentos do tipo melanina evoluiu paralelamente em grupos diferentes de organismos para a proteção contra estresses ambientais (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Para Madhaiyan e colaboradores (2004), bactérias com pigmentação rósea, como é o caso do isolado ACT 02, se caracterizam pela capacidade de crescer utilizando compostos com apenas um carbono como o metanol. Para determinar corretamente qual o pigmento está sendo produzido pelos isolados, outros estudos deverão ser realizados.

##### 5. Teste de atividade enzimática e de solubilização de fosfato inorgânico.

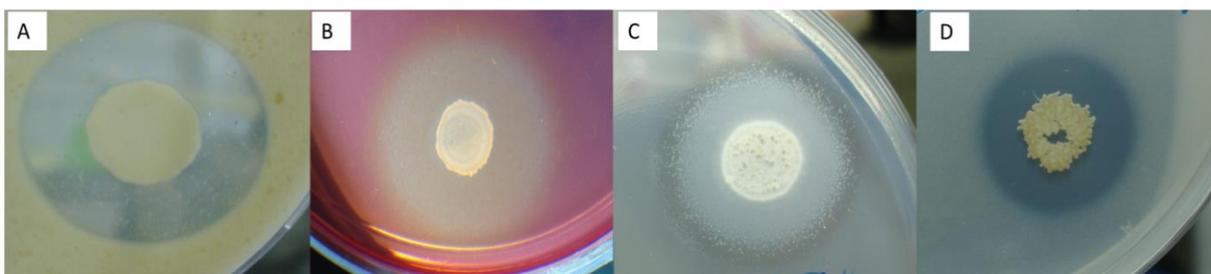
Segundo Ceska (1971), Lin, Chang e Shen (1991) o índice enzimático (IE) é um dos parâmetros semi-quantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos micro-organismos em meio sólido.

A avaliação dos índices enzimáticos de proteases demonstrou que do total de 73 isolados testados, 36 isolados não apresentaram habilidade para degradar a proteína do leite. Resultados positivos foram observados para 37 isolados (50,7%) com a presença de halos claros ao redor das colônias com valores de índices enzimáticos (IE) em média de 1,58, sendo que o menor índice foi de 1,19 (isolado ANA 12) e o maior de 2,10 (isolado ALT 15) (Figura 5). Dentro deste grupo, 3 isolados (APK 02, ALT 15, ALT 16) exibiram valores de IE superiores a 2,0, sendo considerados por Lealem e Gashe (1994) como bons produtores de enzimas extracelulares.

Oliveira A. et. al., (2006) estudando bactérias isoladas de solo da região amazônica identificaram 23 bactérias produtoras de proteases, sendo que o índice enzimático (IE) observado foi em média 1,7 e o maior índice foi de 2,8 e o menor de 1,1 (em anexo Tabela 7). Comparativamente nos 37 isolados testados, o IE para protease foi em média de 1,58, sendo muito próximo ao trabalho de Oliveira A. et. al., (2006), mas o maior índice entre os isolados do Cerrado foi inferior aos das bactérias isoladas no Bioma Amazônico. Estes isolados foram identificados como do gênero *Rhizobium*, sendo este grupo de bactérias conhecidos como bons produtores de enzimas (OLIVEIRA A., et. al., 2006). Em nosso estudo as bactérias avaliadas ainda não foram identificadas e podem ser tanto do gênero *Rhizobium* como de outros gêneros bacterianos, o que deverá ser investigado posteriormente.

Pelos resultados de IE para protease, os isolados APK 02, ALT 15, ALT 16 foram considerados isolados de bactérias promissoras para serem utilizadas em estudos quanto à produção desta enzima, para aplicação biotecnológica (em anexo Tabela 7).

**Figura 5:** Formação de halos de enzimáticos da atividade de celulase, lipase, protease e de solubilização de fosfato dos micro-organismos isolados do solo do CCET/UEG. (A): Halo de hidrólise das proteínas do leite pelo isolado ALT 15, (B): Halo de hidrólise de carboximetilcelulose pelo isolado APK 12, (C): Halo de hidrólise de tween pelo isolado ACT 09, (D): Halo de solubilização de fosfato inorgânico pelo isolado ANA 24 em meio Pikovskaya's.



Fonte: O autor.

Na avaliação da atividade celulolítica, apenas 13 isolados (17,8%) demonstraram capacidade em degradar carboximetilcelulose, com IE médio de 2,64; variando entre 1,91 (ANA 05) a 3,82 (APK 12) (Figura 5b e Tabela 7 em anexo). Os isolados ANA 05 e ALI 02 foram considerados baixo produtores de enzimas. Já 11 isolados se apresentaram como bons degradadores de carboximetilcelulose, dos quais os três isolados com os IE mais altos foram os isolados ANA 13, ALT 06 e APK 12, exibindo valores superiores a 3,2, sendo estes considerados por Lealem e Gashe (1994) como bons produtores de enzimas extracelulares (em anexo Tabela 7).

Silva, Martins e Martins (2015), avaliando a atividade celulolítica de 28 isolados cepas de actinobactérias oriundas de amostras de solo do Parque Nacional de Ubajara, CE, verificaram que 21 destas produziram celulase extracelular. Os autores obtiveram dez isolados com  $IE \geq 2$ , porém o maior valor de IE obtido foi 6,9, valor superior aos obtidos no presente trabalho. Comparativamente nos 13 isolados testados o IE para carboximetilcelulose foi em média de 2,64, sendo superior ao trabalho de Silva, Martins e Martins (2015) no qual o valor médio foi de 2,1 (em anexo Tabela 7). Já Oliveira A. et al. (2006), estudando bactérias isoladas de solo da região amazônica identificaram apenas 6 bactérias com atividade celulolítica extracelular, dos quais apenas uma cepa foi considerada como uma boa produtora de carboximetilcelulase.

Na avaliação da atividade lipolítica, apenas 13 (17,8%) isolados demonstraram capacidade em degradar o tween pela formação de cristais de sais do ácido láurico no meio de

crescimento, com IE médio de 1,81; variando entre 1,25 (ANA 40) a 2,89 (ACT 09) (Figura 5c e Tabela 7 em anexo). Os isolados classificados como bons produtores de enzimas lipolíticas, segundo Lealem e Gashe (1994), foram os isolados ALI 02, ALI 08, ALT 14, ACT 04 e ACT 09. Os demais apresentaram IE inferior a 2,0 (em anexo Tabela 7).

Sacco (2013), avaliando a atividade lipolítica de 16 cepas oriundas de amostras de solo contendo bagaço de cana em decomposição, verificaram que 11 destas produziram lipase extracelular. Os autores obtiveram somente um isolado com  $IE \geq 2,0$ , o maior valor de IE obtido foi 2,7, similar aos obtidos no presente trabalho. Comparativamente nos 13 isolados testados o IE médio para lipase foi de 1,81, sendo esse valor próximo ao encontrado no trabalho de Sacco (2013) no qual o valor médio foi de 1,79 (em anexo Tabela 7). Já Oliveira A. et. al., (2006), estudando bactérias isoladas de solo da região amazônica não identificaram bactérias com atividade lipolítica extracelular com IE superior a 2,0.

A habilidade de solubilização de fosfato é de grande importância no solo, pois as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico aumentam a disponibilidade de fosfato viável para a planta, promovendo o desenvolvimento vegetal em condições de campo (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; GYANESHWAR et al., 2002; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Esta capacidade ganha mais relevância para os solos ácidos como os do Cerrado goiano, já que as reservas de fósforo formam compostos insolúveis com o ferro, alumínio e matéria orgânica, tornando-o indisponível para as plantas, devido a sua elevada reatividade. Sua disponibilização promove vantagens ao desenvolvimento das plantas sendo considerado como um fator importante no crescimento vegetal (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002; SANTOS et al., 2012). Nesse contexto, micro-organismos com capacidade de solubilizar fosfato são desejáveis como uma alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente se utilizados como componentes de inoculantes (VESSEY, 2003; LOPES et al., 2012).

Uma parcela relevante da comunidade microbiana do solo, apresenta a capacidade de solubilizar fontes de fósforo de baixa solubilidade (SOUCHIE et al., 2007) o que acarreta o aumento no fornecimento de fósforo disponível para absorção pela plantas. Neste trabalho os índices obtidos nos testes de solubilização de fosfato inorgânico demonstram que do total de 73 isolados apenas 15 isolados apresentaram valores de índices de solubilização, com IS médio de 1,22; variando entre 1,10 (ANA 33) a 1,44 (ANA 13) para meio NBRI-P (em anexo

Tabela 7). De acordo com Hara e Oliveira (2005) os isolados tem menor capacidade de solubilização de fosfato, pois apresentaram IS inferiores a 2,0.

Costa et al. (2013) avaliando a atividade de solubilização de fosfato de cálcio em 26 bactérias de solo do Cerrado do estado do Piauí verificaram que 18 destas foram capazes de solubilizar fosfato *in vitro* com índice médio de solubilização de 1,48. Este valor foi levemente superior aos encontrados nos isolados da reserva ecológica do CCET/UEG (em anexo Tabela 7).

Já no meio Pikovskaya's 14 dos 73 isolados apresentaram halos de solubilização havendo pouca variação quanto aos índices de solubilização de fosfato inorgânico, com IS médio de 1,52; variando entre 1,35 (ANA 09 e ANA 10) a 2,09 (ANA 24) (em anexo Tabela 7). Todos os isolados foram classificados com menor capacidade de solubilização exceto o isolado ANA 24, que foi classificado como médio solubilizador (Figura 5d, e Tabela 7 em anexo). Estes valores estão próximos dos obtidos por Hara e Oliveira (2005) e por Santos et al. (2012) para bactérias diazotróficas endofíticas.

Costa (2011) relata que apesar da classificação de baixos e altos níveis de solubilização, alguns autores afirmam que qualquer micro-organismo que seja capaz de produzir um halo de solubilização é considerado um solubilizador de fosfato em potencial. Sendo assim, as bactérias isoladas que produziram halos nos meios NBRI-P e Pikovskaya's podem ser consideradas solubilizadoras em potencial para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente se utilizadas como componentes de inoculantes e biofertilizantes.

Nos resultados dos testes de solubilização e degradação em meios de cultura sólidos foi observado que das 73 bactérias, 37 isolados (50,7%) foram capazes de hidrolisar proteínas; 13 isolados (17,8%) demonstraram capacidade de degradar carboximetilcelulose; 13 (17,8%) demonstraram capacidade de degradar tween; 14 isolados (19,2%) apresentaram halo de solubilização de fosfato inorgânico em meio Pikovskaya's e 15 (20,5%) dos isolados demonstraram a mesma habilidade em meio NBRI-P (Tabela 7 em anexo).

Avaliando todos os 73 isolados pela presença de reações catalíticas em cada ensaio foi possível evidenciar que cinco isolados (ANA 01, ANA 05, ANA 08, ALI 08 e ACT 04), apresentaram atividade em quatro dos cinco testes enzimáticos realizados, demonstrando ampla maquinaria metabólica em comparação aos demais isolados (Tabela 7 em anexo).

Resultados positivos em três avaliações foram observados em um grupo de cinco membros (ANA 13, ANA 27, ALI 02, ALI 03 e ALT 14) (Tabela 7 em anexo). 13 isolados apresentaram resultados positivos para apenas dois testes (Tabela 7 em anexo). Dos isolados testados 19 foram negativos para os testes de atividade enzimática. Já 31 dos isolados apresentaram atividade em apenas um teste enzimático (Tabela 7 em anexo).

#### *6. Teste de capacidade de crescimento em meio livre de nitrogênio.*

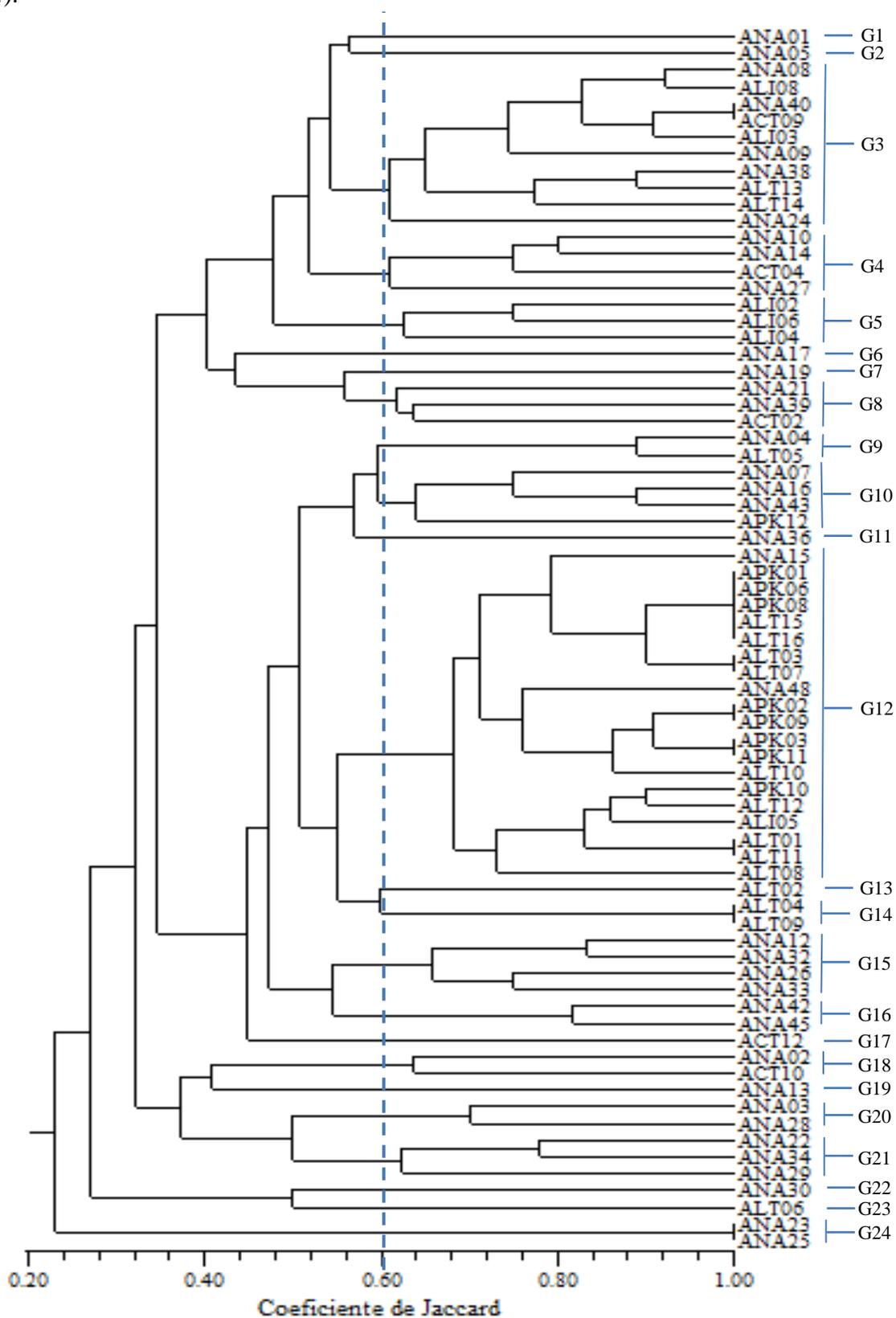
Pelo teste de crescimento em meio livre de nitrogênio foi verificado que 25 isolados formaram uma película em meio de cultura semi-sólido NFB (Tabela 7 em anexo), indicando a possível capacidade de fixar N<sub>2</sub> em condições micro-aerofílicas, o que deverá ser confirmado com teste para a atividade da enzima nitrogenase. Em contrapartida, 48 isolados não formaram película sendo considerados incapazes de metabolizar o nitrogênio atmosférico (Tabela 7 em anexo).

Em um teste realizado com 98 isolados, todos apresentaram a capacidade de formação de uma película característica na superfície do meio, contudo, somente duas amostras apresentaram o resultado positivo para o teste da atividade da enzima nitrogenase (IKEDA, 2010). Deste modo, só poderemos afirmar que estes isolados que formaram película são fixadores de nitrogênio depois de realizar o teste da atividade desta enzima (IKEDA, 2010).

#### *7. Análise do dendrograma.*

Pela análise de agrupamento foi determinada a presença de 24 grupos ou clusters para os 73 isolados, considerando as características morfofisiológicas, sendo estimado 60% de similaridade entre os isolados (Figura 6). Destes 24 agrupamentos, 10 são compostos por apenas uma bactéria (Figura 6), o que pode indicar alta diversidade das bactérias isoladas do solo de Cerrado em estudo. Os grupos G9, G14, G16, G18, G20 e G24 são compostos por apenas duas bactérias (Figura 6). Ainda nesta análise 3 grupos são formados por três bactérias (G5, G8 e G21) e 3 grupos são formados por quatro membros (G4, G10 e G15) (Figura 6). O grupo G3 é formado por dez membros (ANA 08, ANA 09, ANA 24, ANA 38, ANA 40, ALI 03, ALI 08, ALT 13, ALT 14 e ACT 09) sendo este o segundo maior grupo (Figura 6). O grupo G12 foi o maior grupamento formado no dendrograma, sendo composto por 20 micro-organismos (ANA 15, ANA 48, APK 01, APK 02, APK 03, APK 06, APK 08, APK 09, APK 10, APK 11, ALT 01, ALT 03, ALT 07, ALT 08, ALT 10, ALT 11, ALT 12, ALT 15, ALT 16 e ALI 05) (Figura 6) com as características mais similares.

**Figura 6:** Dendrograma de agrupamento de 73 bactérias isoladas do solo de cerrado do CCET/UEG calculado pelo coeficiente de semelhança Jaccard e pelo método UPGMA. Considerando 60% de similaridade como ponto de corte, foram separados 24 grupos (G1 a G24).



Primieri et al. (2013) avaliando a diversidade morfológica de rizobactérias no estado de Santa Catarina considerando o nível de similaridade de 90%, encontrou 37 grupos para seus 295 isolados bacterianos. O maior grupo encontrado por esses autores foi com 93 isolados. No entanto apenas 17 grupos foram formados apenas com 1 isolado. Comparando os resultados de Primieri et al. (2013) aos encontrados no estudo das bactérias do solo do cerrado do CCET/UEG foi detectada uma quantidade inferior de isolados. A diversidade também inferior devido a menor quantidade de grupos (24 grupos) e pela menor quantidade de grupos com apenas 1 bactéria, no entanto essa diferença significativa pode ser explicada pela diferença no nível de similaridade entre os estudos.

Cunha et al. (2013) estudando bactérias do solo de Cerrado, no Campo Experimental Água Boa da Embrapa Roraima, isolou 29 bactérias das quais foram divididas em 22 grupos morfológicos compartilhando 70% de similaridade em suas características. Avaliando os dados de Cunha et al. (2013) com a similaridade de 90%, verificamos a um aumento na quantidade de grupos, 25 grupos com uma bactéria e 2 grupos com dois membros demonstrando também a grande diversidade das bactérias de solo do Cerrado, o que pode corroborar os resultados obtidos com isolados do Solo de Cerrado do CCET/UEG (Figura 6).

#### *8. Avaliação da diversidade pelo índice de Shannon-Weaver.*

A partir do dendrograma (Figura 6) os 24 grupos obtidos foram utilizados para o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver, convencionando os grupos como sendo as OTUs. O índice de diversidade de Shannon-Weaver encontrado foi de 2,68. A partir deste cálculo é possível inferir que a amostragem das bactérias isoladas do solo do Cerrado da CCET/UEG possui grande diversidade.

Vários trabalhos, realizados, avaliando diferentes abordagens, determinaram o índice de diversidade em diferentes regiões do Brasil. Primieri e colaboradores (2013) avaliando as características morfológicas de 295 rizobactérias em Santa Catarina também convencionaram os agrupamentos pelo dendrograma como OTUs e obtiveram o valor de 2,66 para o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver total da amostragem, sendo este valor próximo ao observado no estudo das bactérias do Cerrado goiano.

Junior et al. (2011) avaliando a diversidade de 141 bactérias isoladas do solo de uma região do município de Lagoa Grande, PE verificou que o índice de Shannon-Weaver apresentou valores entre 2,25 e 2,60. Estes valores quando comparados aos encontrados no

estudo das bactérias do solo do CCET/UEG são inferiores, porém próximos, o que evidencia a diversidade das bactérias nos dois ambientes de estudo.

Melz e Tiago (2009) no estudo das propriedades microbiológicas do solo de um parque em Tangará da Serra, MT encontrou índices de diversidade de Shannon-Weaver variando entre 2,74 e 1,09 em um período de seca e chuva respectivamente. Comparando os índices encontrados por Melz e Tiago (2009) foi observado que o índice no período de seca foi superior e no período de chuva inferior ao encontrado no CCET/UEG. Essa diferença de diversidade em condições climáticas distintas demonstra a capacidade de resposta dos microorganismos frente a diferentes condições de estresse.

## CONCLUSÕES

- As características físico-químicas do solo coletado da reserva ecológica do CCET/UEG estão de acordo com as características gerais dos solos do Cerrado.
- Foi possível verificar no solo coletado na reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás a presença de micro-organismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico (celulases, proteases e lipases) e de solubilização de fosfato.
- A contagem dos micro-organismos associada à caracterização morfológica demonstrou a grande diversidade no solo da reserva ecológica do CCET/UEG, os quais se mostraram com um alto potencial biotecnológico para utilização em indústrias e na agricultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

ANDERSEN, H. J.; HINRICHSEN, L. L. Changes in curing agents, microbial counts and volatile compounds during processing of green bacon using two different production technologies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 68, p. 477-487, 1995.

ANDRADE, A. S.; ARAÚJO, F. C.; LIMA, D. T.; CAMPOS, F. M.; PEREIRA, M. C.; DRUMOUND, L. C. D. Atividade Microbiana do Solo Sob Pastagem Intensiva de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro e Sob Cerrado Nativo. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 1, n. 1, p. 1, 2010.

ARIFUZZAMAN, M.; KHATUN, M. R.; RAHMAN, H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 29, p. 4615-4619, 2010.

BARROSO, C. B. **Produção de Pellets Livres e Imobilizados e Mecanismo de Solubilização de Fosfatos Inorgânicos por *Aspergillus niger***. 2006. 94f. Tese (Doutorado em microbiologia agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População Microbiana Total e Solubilizadora de Fosfato em Solo Submetido a Diferentes Sistemas de Cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 2043-2050, 2000.

BATISTA, M. de A.; PAIVA, D. W. de; MARCOLINO, A. **Solos para todos: perguntas e respostas**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2014. 87p. (Embrapa Solos. Documentos, 169).

BULL, A. T. GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 46, p. 219-246, 1992.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CASTILHO, M.A.; FELIS, P.; ARAGÓN, P.; CUESTA, C.; SABATER, C.. Biodegradation of the Herbicide Diuron by *Streptomyces* Isolated From Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, p. 196-202, 2006.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de cultura e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p. 125-132, 1990.

CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. **European Journal of Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971.

COLLINS, M. D.; BRADBURY, J. F. Plant pathogenic species of *Corynebacterium*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1276-1283, 1984.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 669-678, 2010.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção de crescimento vegetal e diversidade denética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.9, p. 1275-1284, 2013.

COSTA, F. M. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de guandu [(cajanus cajan (L.) Millsp.], cultivado na borda Oeste do Pantanal Sul - Mato - Grossense**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, 2011.

CUEVAS, E.; MEDINA, E. Nutrient dynamics whitin amazonian forest ecosystems. In: nutrient flux in fine litter fall and ediciency, of nutrient utilization. **Decologia**, v. 68, p. 446-472, 1986.

CUNHA, E. N.; CHALITA, P. B.; ZILLI, J. E.; SILVA, K. Avaliação da diversidade genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* no estado de Roraima. **XXXIV Congresso Brasileiro de Ciências do Solo**, 2013.

DE-POLLI, H. GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; FRANCO, A. A. Adubação verde: parâmetros para avaliação de sua eficácia. In: CASTRO FILHO, C. de; MUZILLI, o. (Ed) **Manejo integrado de solos em microbacias hidrográficas**. Londrina: IAPAR, 1996. P. 225-242.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. **Journal for the science of food and agriculture**. n. 4, p. 149-155, 1953.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de solos (SiBCS), Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2º Ed. 2006. 216p.

FRIZZO, M. L. S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GERMANO S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. Produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

GHORBEL, B.; KAMOUN, A. S.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 513-518, 2003.

GODFREY, T., WEST, S. (Ed.) **Industrial enzymology**. New York: The Macmillan Press. 609 p., 1996.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n.1, p. 83-93, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Documentos 332**. Embrapa. Brasília: Distrito Federal, 2011.

HYNES, M. F. KRUCKSCH, K.; PRIEFER, U. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 326-332, 1988.

IKEDA, A. C. **Morfofisiológica e Genética de Bactérias Endofíticas Isoladas de Raízes de Diferentes Genótipos de Milho**. 2010. 100f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J. H. Use of shed snakes skin as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, 1990.

JUNIOR, P. I. F.; AIDAR, S. T.; MORGANE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. E.; MARTINS, L. M. V. **Diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas associadas a gramínea tolerante a dessecação *Tripogon spicatus* na Catinga**, In: SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO - Experiências para mitigação e adaptação. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/911537/3/PauloIvan1.pdf>, Acesso em: 15/09/2015.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LEALEM, F., GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnology techniques**, v. 5, n. 5, p. 275-280, 1991.

LOPES, F. M.; RODRIGUEZ, A. G.; PEREIRA-JÚNIOR, M. A.; OLIVEIRA, F. A.; FERNANDES, K. F. Microbiologia Industrial - Aplicações Tecnológicas de Biorreatores na Produção de Biossurfactantes e Biofertilizantes. In: OLIVEIRA, S. S. (Org). **Ciências Moleculares: Volume 2**. Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2012. p. 116-149.

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNADÉZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALEDERÓN, L.; NIETOJACOBO, M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root systems. **Plant Physiology**, v. 129, p. 244-256. 2002.

MCALEECE, N.; GAGE, J. D. G.; LAMBSHEAD, P. J. D.; PATERSON, G. L. J. **Biodiversity professional statistics analysis software**. Jointly developed by Scottish Association for Marine and Natural History Museum London, 1997.

MADHAIYAN, M.; POOGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S. CHUNG, H.; YANG, J.; SUNDARAM, S.; SA, T. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 315-324, 2004.

MANFIO, G. P.; LEMOS, M. F. **Microrganismos e aplicações industriais**. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/4/gilson.html>>. Acesso em 02 mar. 2015.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio". **Comunicado Técnico 19**, Embrapa, Seropédica: Rio de Janeiro, p. 1-14, 1997.

MELLONI, R.; PEREIRA, E. G.; TRANNIN, I. C. B.; SANTOS, D. R.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo Cerrado no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2001.

MELZ, E. M.; TIAGO, P. V. Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 4, p. 829-834, 2009.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 1ed. Lavras: Editora da UFLA, 2006.

NAHAS, E.; SANOMIYA, L. T. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n. 3, p. 69-71, 1998.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their Discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in japan. **Current Opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 367-375, 2002.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; SANTOS, K. J. G.; MOREIRA, F. P. Considerações sobre a acidez dos solos de Cerrado. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2005.

OSA-AFIANA, L. O.; ALEXANDER, M. Clays and the survival of *Rhizobium* during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, p. 285-288, 1982.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 801-811, 1999.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PEREIRA-JÚNIOR, M. A. **Avaliação da Diversidade Metabólica de Micro-organismos de Solo do Cerrado Goiano Após Cultivo de Cana-de-Açúcar**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorous in soil inconnection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v. 17, p. 362-370, 1948.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 429-443, 2006.

PRIMIERI, S.; BRANCO, B. S.; COSTA, M. D.; STROSHEIN, M. R. D.; SANTOS, J. C. P. Diversidade morfológica de rizobactérias em nódulos de bracinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina. **4º SEPEI - Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IFSC**, 2013.

QUAX, W. J. **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**. New York : Springer-Verlag, 2013. p. 193-211.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do Solo e Adubação: acidez e calagem**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Piracicaba, SP. p. 343, 1991.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RODRIGUES, W. A.; KLINGE, H.; FITTKAU, E. J. Estrutura e funcionamento de um ecossistema florestal amazônico de terra firme junto à Reserva Florestal Walter Egler, município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, v.29 p. 219-243, 2000.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 1.70, (software). New York, 1992. 470p.

RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C. G. Invited Review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 843-856, 2005.

RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Isolation of lipid-and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 218-227, 2005.

SACCO, L. P. **Isolamento de Bactérias Produtoras de Enzimas de Interesse em Processos Biotecnológicos**. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. 491p.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. K.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 142-149, 2012.

SILVA, C. J.; SANCHES, L.; BLEICH, M. E.; LOBO, F. A.; NOGUEIRA, J. S. Produção de serapilheira no Cerrado e Floresta de Transição Amazônia-Cerrado do Centro-Oeste brasileiro. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 4, p. 543-548, 2007.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p 2026-2036, 2015.

SORHEIM, R.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology**, v. 17, p. 181-192, 1989.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 80, p. 191-200, 1984.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 45, p. 89-106, 1991.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial exopolysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

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

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F. **Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 19p, 2005.

TOGNON, A. A.; DEMATTÊ, J. L. I.; DEMATTÊ J. A. M. Teor e distribuição da matéria orgânica em latossolos das regiões da floresta amazônica e dos cerrados no Brasil. **Scientia Agricola**. v. 55, n. 3, p. 343-354, 1998.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIFY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 237-241, 2003.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VERMELHO, A. B.; NORONHA, E. F.; FERREIRA FILHO, E. X; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S. Diversity and biochnological applications of procaryotic enzymes. **The Prokaryotes**, p. 214-235, 2013.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VITAL, A. R. T.; GUERRINI, I. G.; FRANKEN, W. K.; FONSECA, R. C. B. Produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes de uma floresta estacional semidecidual em zona ripária. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 793-800, 2004.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 386-392, 1998.

YU, P. J.; CHOU, C. C. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. **Food Technolgy and Biotechnology**, v. 43, p. 283-288, 2005.

## CAPÍTULO 2

### INTRODUÇÃO

As bactérias têm sido amplamente empregadas como produtoras de diferentes substâncias de interesse econômico, sendo uma excelente fonte de enzimas. Os micro-organismos por sua amplitude metabólica e bioquímica, e por possuírem uma gama de possibilidades de produção de biomoléculas com estereoespecificidade e grande diversidade de composição são utilizados como biofábricas (TUBESHA; AL-DELAIFY, 2003; YU; CHOU, 2005).

As enzimas são proteínas presentes e atuam no metabolismo de todos os seres vivos, com capacidade de catalisar e acelera reações químicas. São biocatalizadores de natureza proteica, produzidos por animais, vegetais e micro-organismos (FELIX; NORONHA; MARCO, 2004). Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas quantidades e são recuperadas no final do processo; não realizam reações energeticamente desfavoráveis, não modificam o sentido dos equilíbrios químicos, mas aceleram sua realização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Em relação às enzimas obtidas a partir de animais, plantas e aos catalisadores químicos, as de origem microbianas apresentam inúmeras vantagens, principalmente por serem produzidas em grandes quantidades por processos biotecnológicos que atingem elevada produtividade, considerando que os micro-organismos possuem menor tempo de produção (LIMA et al., 2001; OLIVEIRA A. et al., 2007).

Geralmente as enzimas produzidas pelas bactérias são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação. Outra vantagem da produção de enzimas por bactérias se deve ao rápido crescimento das bactérias, e em geral seus substratos de crescimento são relativamente baratos, podendo ser utilizados até subprodutos agrícolas e industriais (GERMANO et al., 2003).

Proteases, peptidases ou peptídeo hidrolases (Subclasse EC 3.4.) são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas de cadeias proteicas, produzindo pequenos peptídeos, liberando os aminoácidos para serem utilizados pelas células (RAO et al., 1998; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Fazendo isto, elas causam alterações irreversíveis ou a destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes,

principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). Há dois grupos principais de proteases quanto ao local de quebra das ligações peptídicas, as endopeptidases (EC 3.4. 21-99) que quebram as ligações no interior da cadeia e as exopeptidases (EC 3.4.11-19) que clivam as ligações nas extremidades das cadeias polipeptídicas (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular classificam as proteases em seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade em relação ao substrato: serina protease I (ex. tripsina), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina), metalo protease II (ex. termolisina) e aspartil protease (ex. quimosina). Cada família de protease possui resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (BEYNON, 1996).

De acordo com Rao et al. (1998), as serino-proteases que são caracterizadas pela presença de um grupo serino no seu sítio ativo e são reconhecidas pela inibição irreversível por PMSF, entre outros; proteases aspárticas, comumente conhecidas como proteases ácidas, que são endopeptidases que dependem de resíduos de ácidos aspárticos para sua atividade catalítica e são inibidas por Pepstatin A; cisteíno-proteases que possuem sua atividade dependente de um par catalítico contendo resíduos cisteína e histidina e geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores como a cisteína; metaloproteases que constituem o tipo catalítico mais diverso das proteases e são caracterizados pela necessidade de um íon metálico bivalente para sua atividade e por isso são inibidas por quelantes de metais como o EDTA.

As proteases estão entre as enzimas de maior importância no mercado, sendo responsáveis por uma alta movimentação financeira no setor enzimático e estão entre os mais importantes grupos de enzimas industriais representando aproximadamente 60% do mercado mundial, porém sua produção está concentrada em poucas empresas que dominam o mercado enzimático (MOREIRA et al., 2002; GERMANO et al., 2003; KUMAR et al., 2005).

O gênero *Bacillus* é o grupo de bactérias mais utilizado industrialmente para a produção de proteases. Estas enzimas são empregadas na indústria de detergentes, na indústria alimentícia, indústria farmacêutica, tratamento de couro, recuperação da prata em filme de raios X e no tratamento de resíduos industriais (MERHEB et al., 2007). Como novos bioprodutos estão constantemente em desenvolvimento, isto tem provocado uma demanda

crecente de novos isolados bacterianos que produzam proteases diferentes, com alta eficiência, especificidade e, ainda, que atuem em determinados substratos sem interferir em outros. Outras características podem ser exigidas em determinados processos, sendo a seleção necessária para que a enzima seja ideal para sua finalidade nas cadeias de produção industriais, podendo resultar em produtos mais eficientes e com aplicações inovadoras (NOVOZYMES, 2005; MERHEB et al., 2007; ALVES et al., 2014).

Neste estudo foi avaliada a diversidade da microbiota do solo de Cerrado, para auxiliar na seleção de bactérias produtoras de proteases para uso industrial. Estes dados exploratórios poderão ser aplicados em outros estudos biotecnológicos com a utilização das proteases.

## **METODOLOGIA**

### *1. Seleção das bactérias proteolíticas e caracterização microscópica.*

Foram selecionadas 3 bactérias (APK 02, ALT 15, ALT 16) que apresentaram os maiores índices de enzimáticos (IE) a partir dos testes de atividade proteolítica em placa de Petri realizados no capítulo anterior. O parâmetro considerado para a seleção foi o índice enzimático superior a 2,0. Após a seleção estas bactérias foram separadas para a utilização em testes posteriores.

A caracterização microscópica das bactérias proteolíticas foi realizada por meio do preparo de esfregaços bacterianos corados pelo método de Gram conforme metodologia descrita pelo Ministério da Saúde (2001). Após a coloração, as lâminas foram fotografadas em sistema de captura de imagem (LEICA® EC 3) acoplado ao microscópio óptico (LEICA® DME) utilizando o software Leica Application Suite EZ (V. 2.0.0).

### *2. Curva de crescimento nos caldos nutriente e leite.*

Para obtenção do perfil de crescimento das células em diferentes meios de cultivo, as colônias isoladas em placas das bactérias selecionadas foram inoculadas em 10 mL de caldo nutriente (pré-inóculo) e incubadas sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24 horas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do pré-inóculo e transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo nutriente e caldo leite, sendo as culturas mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. O teste foi realizado em triplicata para os três isolados produtores de proteases (APK 02, ALT 15, ALT 16). Deste sistema de cultivo foram coletadas amostras de 5 mL nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 168 horas. O crescimento bacteriano foi verificado através da densidade óptica em 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220).

### *3. Determinação de proteínas totais.*

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Alíquotas de 500 µL das amostras das culturas bacterianas foram tratadas com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> na proporção de (1:1) e deixadas em repouso por 30 minutos para a obtenção das proteínas totais solúveis. Desta lise, 100 µL foram utilizados para a dosagem com o reagente de Bradford (900 µL) em seguida foi determinada a absorbância em 595 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220).

A curva padrão foi realizada a partir de 100  $\mu\text{L}$  de soluções de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações de 2 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  adicionadas a 900  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm e os dados coletados foram utilizados para elaboração da equação da reta para o cálculo da concentração de proteína das amostras.

#### *4. Determinação da atividade proteolítica no extrato bruto.*

Para a determinação da atividade proteolítica no extrato bruto, colônias isoladas em placas de Petri das bactérias selecionadas para produção de proteases, foram inoculadas em 10 mL de caldo nutriente (pré-inóculo), e incubadas sob agitação a 150 rpm a 30 °C por 24 horas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do pré-inóculo e transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo leite sendo as culturas mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. O teste foi realizado em triplicada para os três isolados produtores de proteases (APK 02, ALT 15, ALT 16).

Deste sistema de cultivo foram coletadas amostras de 1 mL diariamente, 0, 24, 48, 72, 96 e 168 horas. As amostras do cultivo foram centrifugadas em microtubos a 13.000 rpm por 3 minutos para a separação da biomassa celular e das substâncias insolúveis do sobrenadante.

A atividade das proteases foi analisada com o substrato azocaseína (Sigma-Aldrich) utilizando o seguinte método: 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram misturados a 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 e 100  $\mu\text{L}$  de azocaseína (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Essa mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C e interrompida com a adição de 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A mistura foi centrifugada por a 13.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante (800  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado a 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 1,8 mol  $\text{L}^{-1}$ . A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 420 nm (SILVA-NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; DETTMER; AYUB; GUTTERRES, 2011).

Uma unidade enzimática por mililitros é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,001 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste.

O controle foi realizado com a adição das mesmas quantidades do sobrenadante, de tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7 e de azocaseína 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  através da adição do TCA 10% no tempo zero da reação enzima e substrato.

### 5. Preparo das amostras proteicas para eletroforese SDS-PAGE

Para realizar a análise das proteínas totais das bactérias avaliadas, estas foram crescidas em caldo nutriente por 24 horas sob agitação de 150 rpm em um agitador tipo *shaker* com temperatura de 30 °C. Após o tempo de incubação foram transferidas alíquotas de 3 mL dos inóculos para microtubos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante então foi descartado e a massa celular lavada 3 vezes com 500 µL de água destilada estéril. Após o processo de lavagem foram adicionados 100 µL de tampão fosfato 10 mmol mL<sup>-1</sup> pH 7,0 na massa de células e em seguida a mistura foi homogeneizada. A partir daí os microtubos foram submetidos a lise térmica por congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento rápido em banho Maria a 45 °C por 10 vezes. Após esta etapa foram adicionados 100 µL de tampão de amostra (Tris 10 mmol pH 6,8, 1% de beta-mercaptoetanol, 2% SDS, 15% de glicerol) e em seguida as amostras foram fervidas por 10 minutos. Por fim os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante então foi coletado em novos microtubos para que as amostras fossem utilizadas nas análises em gel de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970 adaptado).

### 6. Gel de eletroforese SDS-PAGE

Para a avaliação do perfil das proteínas totais das bactérias isoladas para produção de proteases, foi realizada a separação por eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para observação da variação do perfil proteico dos testes de crescimento nos meios: caldo nutriente e caldo leite. As amostras utilizadas para o preparo do gel foram as descritas no item anterior. Foram aplicados no gel 40 µL das amostras em cada poço e 10 µL da Protein Mark (Sigma) como referência de massa molecular (kDa). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) em sistema descontínuo: 4,5% gel concentrador e 12,5% gel separador segundo Laemmli (1970). O gel foi submetido a uma corrida com 100 V por 1 hora e posteriormente a 70 V por 3 horas em tampão Tris-glicina pH 8,0 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As bandas foram coradas em azul de coomassie G-250 (Sigma-Aldrich) e descoradas segundo Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989). O gel foi fotografado em fotodocumentador *MultiDoc-it*<sup>®</sup> (UVP) com luz branca. As bandas resultantes foram analisadas utilizando o software *Vision Works LS*<sup>®</sup> (UVP).

### 7. Extração do DNA cromossomal.

A extração de DNA das bactérias selecionadas para produção de proteases foi realizada a partir de 2 mL da cultura bacteriana incubada por 24 horas em mesa agitadora do tipo *shaker* a 150 rpm a 30 °C. Estas foram centrifugadas por três minutos a 13.000 rpm para obtenção de massa celular. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 600 µL de solução de lise (50 µmol de Tris pH 7,6; 20 mmol de EDTA; 400 mmol de NaCl, 1% SDS) e as amostras foram incubadas em termostatizador (TE 2005, Tecnal<sup>®</sup>) por 10 minutos a 80 °C. Após esta etapa as amostras foram transferidas para banho de gelo por 5 minutos e foram adicionados 3 µL de solução de RNase (20 µg mL<sup>-1</sup>) e foram incubadas a temperatura de 37°C por 15 minutos. Após os 15 minutos foram acrescentados 200 µL de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> na mistura que foi homogeneizada por inversão, retornando os microtubos para o banho de gelo por mais 5 minutos. Estes então foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos contendo 600 µL de isopropanol (P.A.) em uma temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram levadas ao banho de gelo por mais 10 minutos. A mistura foi centrifugada (13.000 rpm) novamente por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado em 600 µL de etanol 70% e foi centrifugado (13.000 rpm por 2 minutos), sendo o etanol descartado ao final da centrifugação. O precipitado foi seco à temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse intervalo o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura estéril e estocado em ultrafreezer (Q315U-32, Quimis<sup>®</sup>) a -20°C para análises posteriores (CHUEIRE, 2003).

### 8. Reação de polimerização em cadeia (PCR).

O DNA extraído de cada bactéria foi amplificado para a região 16S rRNA utilizando a técnica de PCR segundo a técnica modificada por Arturo e colaboradores (1995). Para a amplificação do gene 16S rRNA do material genético extraído das bactérias selecionadas foram utilizados os seguintes *primers* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGG-3') e Y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991).

A amplificação ocorreu em termociclador (MJ 96+ / MJ 96G *Biocycler*<sup>®</sup>) com 20 µL de uma mistura reacional sendo: 2,0 µL de tampão para PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM); 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,5 µL de dNTP (2,5 mM); 0,4 µL (6,67 pmol) dos *primers* Y1 e Y3 sintetizados pela *Invitrogen*<sup>®</sup>; 0,3 µL de Taq DNA Polimerase *Invitrogen*<sup>®</sup> (5 U µL<sup>-1</sup>); 2,0 µL de amostra de DNA molde e 13,2 µL de água ultrapurificada estéril.

A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 28 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), anelamento (30 segundos a 62 °C) e extensão (40 segundos a 72 °C), um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos com uso do termociclador. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese (REIS JÚNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2004).

#### *9. Eletroforese em gel de agarose.*

A certificação da eficácia da extração de DNA e da reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada por meio da análise por gel de eletroforese a 0,7%. As amostras de DNA foram adicionadas em um tampão de amostra FSUDS (azul de bromofenol 0,25% SDS 0,1%, Ficol<sup>®</sup> 20% em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) na proporção de 7:3 (FSUDS:DNA) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X a 90 V por 40 minutos.

Ao final da corrida o gel de agarose foi corado com brometo de etídio 0,5 µg mL<sup>-1</sup> seguido por uma lavagem em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*<sup>®</sup> (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1 kb DNA Ladder<sup>®</sup> (BIOLABS).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Seleção das bactérias proteolíticas e caracterização por coloração de Gram.

As bactérias utilizadas neste estudo foram selecionadas quanto à capacidade de produção de proteases, especificamente de ação sobre a caseína do leite. Foram selecionados os isolados bacterianos APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos de solo do Cerrado do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET/UEG. Estes foram avaliados quando a produção de halo em placa contendo meio leite, sendo identificado o IE de 2,02 para APK 02, de 2,10 para ALT 15 e 2,07 para ALT 16, sendo estas consideradas de alta atividade na produção de protease. A enzima liberada foi considerada uma exoprotease por ter sido liberada no meio de cultivo (Figura 7).

**Figura 7.** Formação de halos enzimáticos pelas bactérias selecionadas APK 02, ALT 15 e ALT 16 para produção de proteases em meio leite sólido juntamente com o controle sem bactéria (CNT).



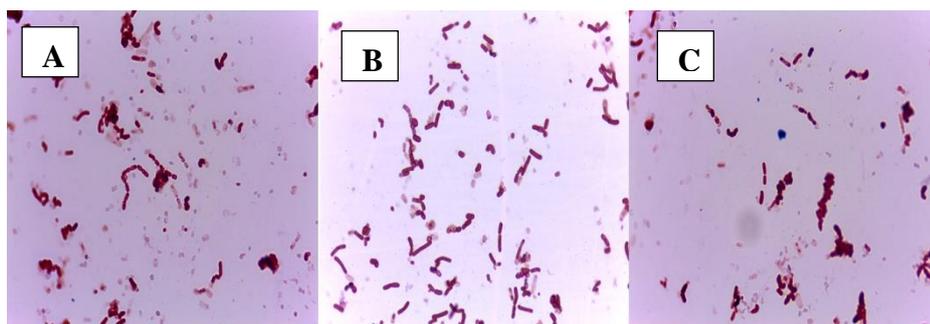
Fonte: O autor

A atividade sobre a caseína do leite é um indicativo de que esta protease é uma caseinase. A atividade de caseinase foi observada para proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de amostras de vegetais armazenadas, utilizando esta mesma metodologia (SHARAF; EL-SAYED E ABOSAIF, 2014). Bactérias isoladas de solo de Cerrado de Minas Gerais foram identificadas também para produção de caseinase a partir de

testes em placa de Petri, indicando que este teste é eficiente na seleção de bactérias produtoras de enzimas extracelulares com atividade sobre a caseína do leite (ALVES et al., 2014).

As células bacterianas podem apresentar variadas formas, desde bastonetes retos a espirais, cocos, ramificados entre outras (ARAUJO, 1994). A caracterização microscópica das bactérias selecionadas para produção de proteases APK 02, ALT 15, ALT 16, demonstrou que estas são bacilos Gram-negativos (Figura 8). Estes resultados descartam a possibilidade destas bactérias serem do gênero *Bacillus*, pois este gênero apresenta células Gram positivas (ALVES et al., 2014). A determinação taxonômica destes isolados deverá ser realizada posteriormente a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

**Figura 8.** Células coradas por técnica de Gram e observadas por meio de microscopia em objetiva de 1000X (imersão). (A): células em forma de bacilos Gram-negativas do isolado ALT 15; (B): células em forma de bacilos gram-negativas do isolado ALT 16; (C): células em forma de bacilos gram-negativas do isolado APK 02.



Fonte: O autor

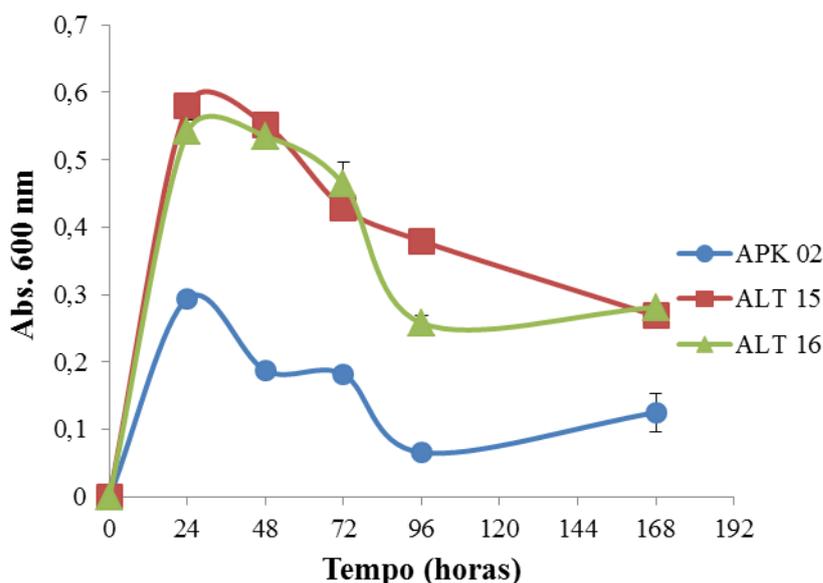
## 2. Curva de crescimento em caldo nutriente e meio leite.

Sob as condições experimentais avaliadas, os isolados selecionados para produção de proteases apresentaram características de crescimento significativamente distintas quando avaliadas em diferentes meios de cultivo (Figura 9 e 10).

Os perfis de crescimento das bactérias no caldo nutriente demonstraram que os três isolados apresentaram sua maior taxa de crescimento em 24 horas. A partir deste dado é possível supor que a fase *lag* foi curta e as células atingiram a fase exponencial rapidamente o que caracteriza os micro-organismos de crescimento rápido (SWINNEN et al., 2004). O máximo crescimento foi observado para os isolados ALT 15 e ALT 16 que apresentaram absorvâncias em torno de 0,580 a 600 nm com 24h de crescimento e após este período as culturas já entraram na fase de declínio (Figura 9). Já para o isolado APK 02 foi observado

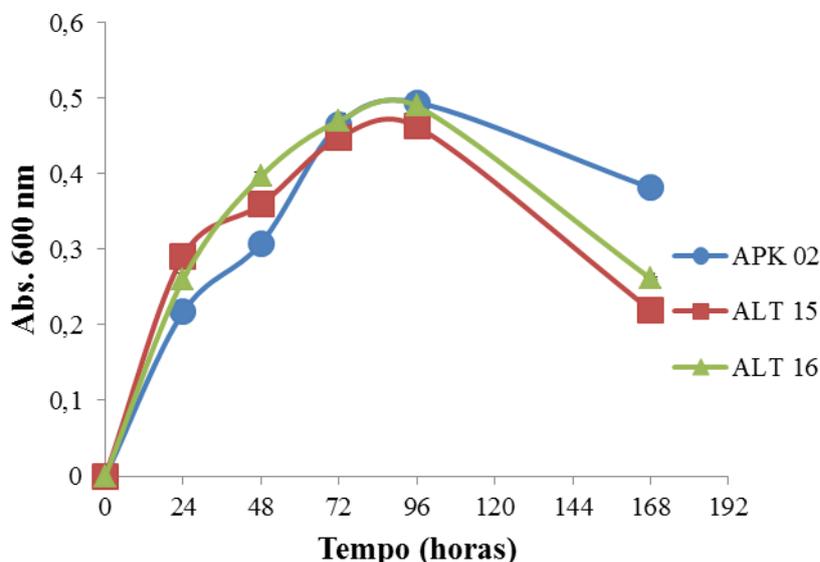
um crescimento menor (0,3 a 600 nm) indicando um crescimento característico para este isolado que pode ter uma taxa de multiplicação menor (Figura 9) com 24 horas. Apesar do menor número de células, esta bactéria apresentou perfil de crescimento semelhante ao dos isolados ALT 15 e ALT 16, sendo que depois de 24 horas também entrou na fase de declínio (Figura 9).

**Figura 9.** Curva de crescimento dos isolados bacterianos APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG obtida pelo crescimento em caldo nutriente sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.



Os perfis de crescimento das bactérias selecionadas no caldo leite indicou que os três isolados apresentaram perfis muito semelhantes (Figura 10). O máximo de crescimento observado foi em 96 horas de cultivo sendo que a fase exponencial dos isolados APK 02, ALT 15 e ALT 16, foi bem mais longa neste meio quando comparada aos resultados obtidos no caldo nutriente líquido. Os três isolados apresentaram absorvâncias máximas em torno de 0,5 a 600 nm (Figura 10). O isolado APK 02 no caldo leite obteve um melhor desenvolvimento quando comparado ao caldo nutriente, indicando que esta bactéria se desenvolve melhor na presença da proteína do leite. O crescimento diferencial dos isolados nos meios testados também foi observado para outros micro-organismos indicando uma variação de resposta tanto do organismo quanto das condições ambientais impostas (LONGHI, 2012).

**Figura 10.** Curva de crescimento dos isolados bacterianos APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG obtida pelo crescimento em caldo leite sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.



O pH do caldo leite no final do período de cultivo de 168 horas, foi determinado e não foi observado alteração, ficando em torno de pH 7,0. Este dado sugere que a protease que age sobre a caseína, é uma enzima neutra como observado para proteases de *Bacillus* (FRANKENA; VAN; STOUTHAMER, 1985). Frankena, Van e Stouthamer (1985) identificaram peptidases com atividade entre pH de 5 a 8, sendo que estas apresentaram também uma característica quanto ao limite de tolerância a temperatura e sendo ainda observado a capacidade de clivagem de aminoácidos hidrofóbicos para esta enzima obtida de *Bacillus* (RAO et al., 1998, CORRÊA et al., 2011).

Estas outras características não foram investigadas para os isolados estudados, o que deverá ser feito posteriormente, para identificar se há similaridade quanto ao delineamento da atividade destas proteases.

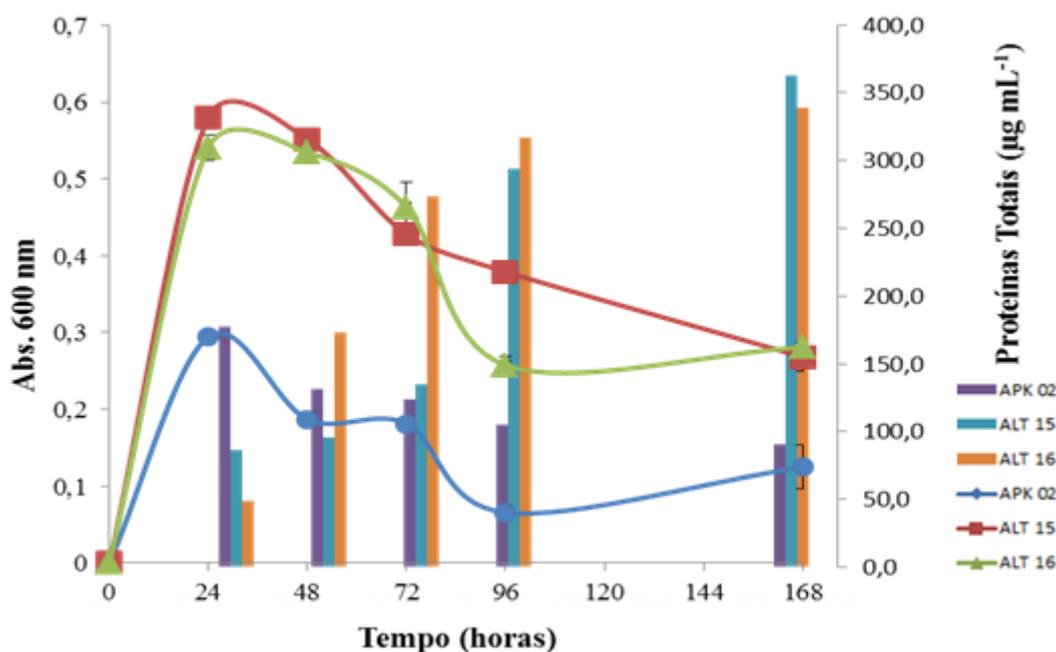
Proteases neutras foram identificadas em bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, sendo utilizadas para vários processamentos em produtos lácticos como na produção do queijo tipo *cheddar* (MCGARRY et al., 1994; CORRÊA et al., 2011; SEVINC; DEMIRKAN, 2011). Assim, deverão ser realizados ensaios para determinar a efetiva utilização das caseinases obtidas dos isolados em estudo em processos biotecnológicos nas mais variadas áreas.

### 3. Determinação de proteínas totais.

As proteínas totais foram quantificadas através da metodologia de Bradford (1976). Alíquotas foram quantificadas diariamente com intuito de monitorar qual o período (horas) de maior produção de proteínas e o período de degradação das mesmas do meio de cultivo.

Os micro-organismos estudados apresentaram um perfil comum de crescimento bacteriano no caldo nutriente, sendo que apenas a fase lag, por ser muito curta, não foi identificado um período determinado (MADIGAN et al., 2010). A fase exponencial se deu até 24 horas e a fase estacionaria ficou entre 24 e 48 horas. Já a fase de declínio se deu após 48 horas (Figura 11)

**Figura 11.** Dosagem de proteínas totais (eixo Y2) e curva de crescimento dos isolados bacterianos (eixo Y1) APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG produtoras de caseinase, obtida pelo crescimento em caldo nutriente sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.



$$\text{Teor proteico no caldo nutriente} = 0,0352x + 0,1191 \quad (R^2 = 0,9968).$$

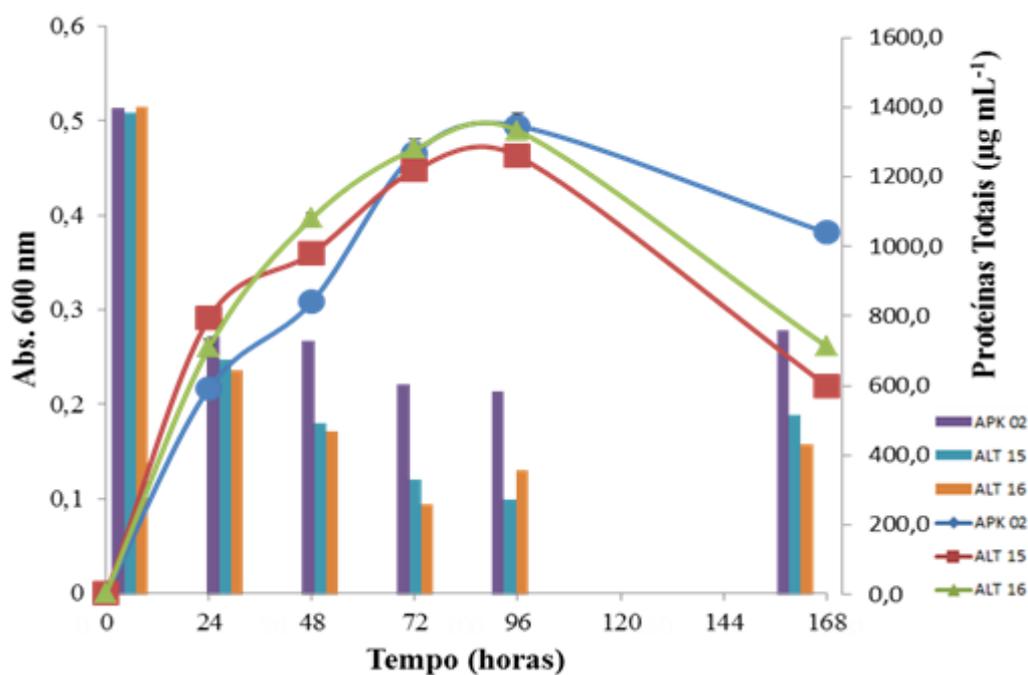
As dosagens em caldo nutriente demonstraram que proteínas foram mais intensamente produzidas em 24 horas apenas para o isolado APK 02. Já para os isolados ALT 15 e ALT 16 o período de maior detecção das proteínas foi em 168 horas de cultivo. Estas informações podem indicar que não há uma correlação direta entre quantidade de proteínas totais e crescimento bacteriano nos diferentes isolados. Pelos resultados obtidos é possível inferir que

os isolados ALT 15 e ALT 16 são mais similares fisiologicamente do que o isolado APK 2 (Figura 11), mas em funções morfológicas são iguais (Tabela 6 em anexo).

Durante o crescimento de micro-organismos em geral são necessárias grande quantidade de proteínas para a manutenção da divisão celular e geração de energia como enzimas relacionadas à replicação, transcrição e tradução de proteínas nas células (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Assim, a bactérias APK 2 apresentou um perfil metabólico diferenciado onde foi observado que na fase de crescimento exponencial das células, o conteúdo proteico foi alto. Mas os dois outros isolados não responderam do mesmo modo indicando estratégias fisiológicas diferentes (Figura 11).

Já para o caldo leite os isolados obtiveram uma expressiva diminuição da proteína do leite no meio de cultivo em 24 horas, seguindo por uma degradação menor até 96 horas de cultivo (Figura 12). Como a curva de crescimento foi determinada concomitantemente com o conteúdo proteico foi observado que o crescimento bacteriano máximo para os isolados ocorreu em 96 horas de cultivo.

**Figura 12.** Dosagem de proteínas totais (eixo Y2) e curva de crescimento dos isolados bacterianos (eixo Y1) APK 02, ALT 15, ALT 16 obtidos do solo de Cerrado CCET/UEG produtoras de caseinase, obtida pelo crescimento em caldo leite sob agitação (150 rpm) a 30 °C monitorados por 168 horas.



$$\text{Teor proteico no caldo leite} = 0,0243x + 0,1358 \quad (R^2 = 0,9951).$$

Desta forma o crescimento no caldo leite indica que houve a utilização dos resíduos de degradação da caseína, que podem ter se deslocados para a manutenção da divisão celular (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; MADIGAN et al., 2010). Já após 96 horas, na fase de declínio, a diminuição do conteúdo proteico pode ser pela mortalidade das células. Sendo que quando há morte celular não vai haver utilização dos aminoácidos e peptídeos para novo crescimento. Por isso no final do período avaliado ainda foi possível a detecção de proteína no meio de cultivo. Outra hipótese que pode ser considerada é que o decaimento da absorbância na curva de crescimento, após 96 horas, pode estar diretamente relacionado ao fim da disponibilidade da fonte nutricional (MADIGAN et al., 2010).

Já Fedatto (2004), acompanhando o crescimento de bactérias *Xylella fastidiosa* observou que proteínas foram mais intensamente produzidas no início da fase log de crescimento, sendo indício de que as bactérias produzem mais proteínas antes do pico de crescimento. Este micro-organismo teve uma resposta característica de acordo com sua fisiologia e constituição genética, e nos isolados estudados também foi possível observar diferentes estratégias na utilização das proteínas de acordo com a fisiologia e a resposta à presença de diferentes meios de cultivo.

#### 4. Gel de eletroforese SDS-PAGE para a avaliação do perfil proteico

Amostras do cultivo em caldo leite e nutriente dos três isolados por 168 horas foram utilizadas para a análise do perfil proteico por SDS-PAGE. As bandas detectadas foram analisadas quanto à massa molecular avaliando a intensidade e a quantidade de bandas nas amostras comparando o perfil proteico do crescimento em meio leite com o meio nutriente (Figura 13).

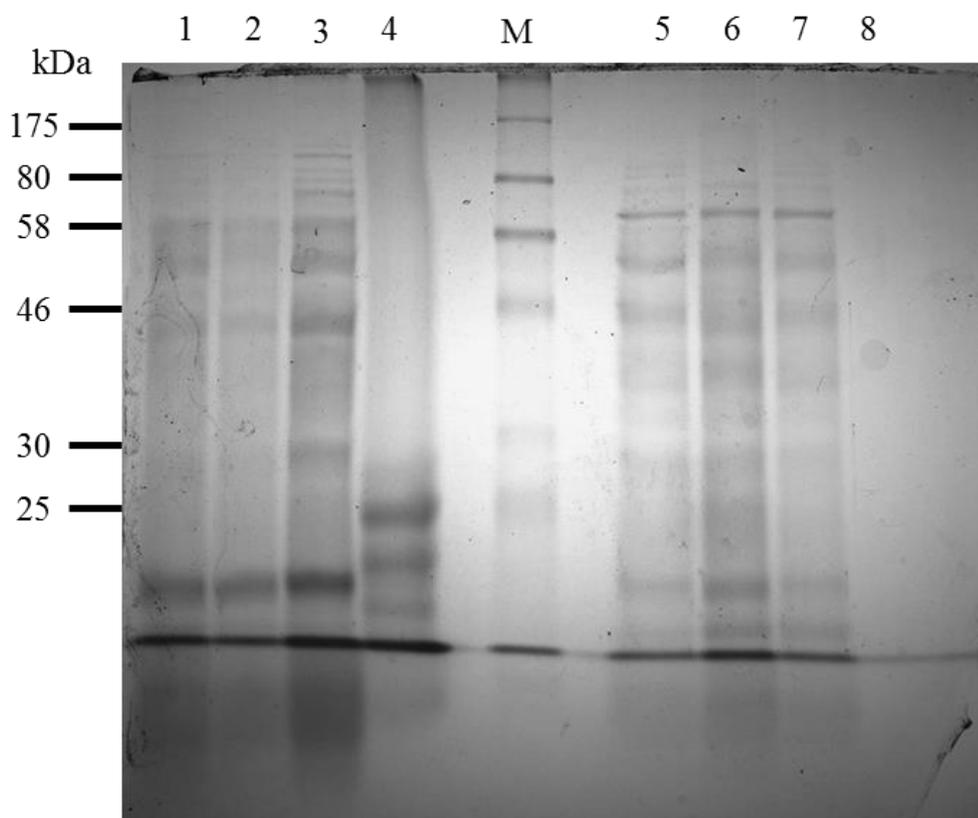
O perfil proteico dos isolados crescidos no caldo nutriente apresentou bandas de baixa intensidade variando entre 100 e 10 kDa (Figura 13 linhas 5, 6 e 7). Não foram observadas grandes diferenças quanto ao perfil destas, indicando que estas podem pertencer a um mesmo gênero taxonômico. Para as amostras das bactérias crescidas em caldo leite também foi detectado um número variável de bandas com massa molecular entre 100 e 10 kDa, mas neste meio as bandas foram intensas e foi possível detectar diferenças quando comparado ao perfil proteico das bactérias crescidas em caldo nutriente.

Para observar se as proteínas do leite presente no meio de cultivo ainda estavam presentes no final do ensaio de crescimento foi utilizado um controle negativo (meio leite sem

adição de bactérias). O perfil obtido com o controle negativo forneceu 3 bandas intensas de 24,8; 23,3 e 19,6 kDa (Figura 13 linha 4). A análise do perfil proteico de leite em pó foram realizadas por Farrel-Júnior et al. (2004) e Marques et al. (2011) que observaram a presença de proteínas com massa molecular entre 25 e 19 kDa. Esses valores foram semelhantes aos obtidos para análise do caldo leite (controle negativo).

No final de 168 horas de cultivo das bactérias APK 2, ALT 15 e ALT 16 em caldo leite foi observada uma alteração no perfil proteico quando comparado ao controle negativo (caldo leite). Essa diferença foi verificada com a presença de uma banda com maior intensidade em torno de 20 kDa e o desaparecimento das bandas referente ao controle negativo (Figura 13 linhas 1, 2, 3 e 4).

**Figura 13.** Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida do perfil proteico das bactérias selecionadas para produção de proteases nos meios: caldo leite e caldo nutriente. Linha 1 – Isolado APK 02 crescido em caldo leite; Linha 2 – Isolado ALT 15 crescido em caldo leite; Linha 3 – isolado ALT 16 crescido em caldo leite; Linha 4 – controle negativo caldo leite; Linha 5 – Isolado APK 02 crescido em caldo nutriente; Linha 6 – Isolado ALT 15 crescido em caldo nutriente; Linha 7 – isolado ALT 16 crescido em caldo nutriente; Linha 8 – controle negativo caldo nutriente; M - marcador Protein Mark (25 a 175 kDa) - Sigma.



Fonte: O autor

Através desta análise sugerimos que essas bandas possam ser uma protease com atividade sobre a caseína do leite, ou seja, uma caseinase. Esta estaria em maior concentração quando comparado ao perfil proteico do meio nutriente. Essa diferença se dá pela necessidade de produção destas enzimas pelas bactérias para a degradação das proteínas do leite presentes no meio de indução (caldo leite) para a utilização no seu metabolismo.

As peptidases já foram observadas em micro-organismos como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xylella*, sendo que diferentes massas moleculares foram atribuídas para estas proteases (KAMATH; KAPATRAL; CHAKRABARTY, 1998; FEDATTO, 2004; SEVINC; DEMIRKAN, 2011) Em *Bacillus* sp. várias proteases foram descritas contendo massa molecular entre 75 (JUNG et al., 2007) a 30 kDa (HUANG et al., 2006). Em bactérias do gênero *Salinivibrio* sp. uma protease com atividade de caseinase foi isolada apresentando massa molecular de 21 kDa para uma enzima de cadeia monomérica (SHAHBAZI; KARBALAEI-HEIDARI, 2012). A massa desta proteína é semelhante a massa encontrada nos isolados estudados neste trabalho. Apesar desta semelhança outros ensaios deverão ser realizados para comprovar a natureza enzimática desta proteína, assim como sua estrutura.

##### 5. Determinação da atividade proteolítica no extrato bruto do caldo leite.

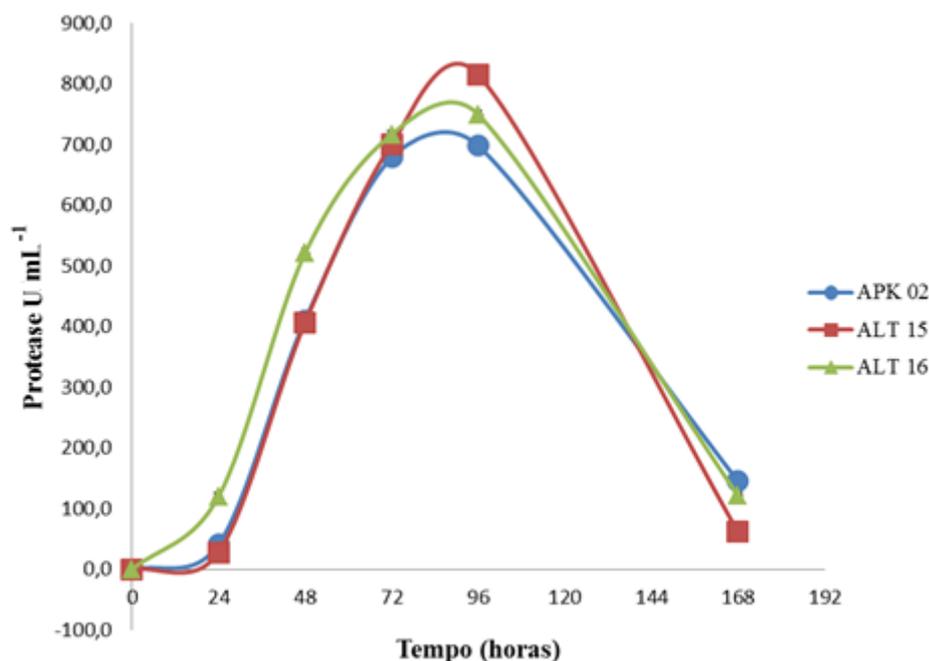
Para comprovar a presença da atividade de protease foram realizadas dosagens enzimáticas nos tempos de cultivo em caldo leite de 24, 48, 72, 96 e 168 horas de crescimento sendo que foi identificada a maior atividade em 96 horas.

Fry, Huang e Milholland (1994) observaram uma relação entre o crescimento de *Xylella fastidiosa* e a atividade de protease, sendo que maior crescimento e produção de protease foi atingido por volta do terceiro dia de cultivo em contrapartida Ward (1985) sugere que micro-organismos do gênero *Bacillus*, geralmente, produzem maior quantidade de protease ao final da fase exponencial de crescimento.

Em estudos com *Salinivibrio* sp. foi identificada atividade de protease em meio mínimo onde foi detectado que enzima protease tem uma produção máxima com 48 horas e permanece constante até 72 horas de cultivo (SHAHBAZI; KARBALAEI-HEIDARI, 2012). Esta protease se caracteriza por ter expressão constitutiva sem ser necessário meio de indução (SHAHBAZI; KARBALAEI-HEIDARI, 2012). Este resultado é bem diferente do obtido para os isolados, pois além de ter pico de atividade mais tardio, a atividade catalítica não permanece estável (Figura 14).

A atividade máxima detectada para os isolados foi para APK 2 de  $698 \text{ U mL}^{-1}$ , para ALT 15 de  $815 \text{ U mL}^{-1}$  e para o isolado ALT 16 de  $750 \text{ U mL}^{-1}$  com 96 horas de cultivo (Figura 14). A atividade de protease em *Salinovibrio* foi em torno de  $500 \text{ U mL}^{-1}$  para 72 horas de cultivo em meio basal (SHAHBAZI; KARBALAEI-HEIDARI, 2012), sendo a atividade máxima menor do que a obtida para os isolados (Figura 14)

**Figura 14.** Curva de produção de protease extracelular no extrato bruto pelas bactérias selecionadas (APK 02, ALT15 e ALT 16) utilizando azocaseína como substrato.



Corrêa (2009) avaliando a atividade de uma linhagem de *Bacillus* em meio farinha de pena detectou valores máximos em torno de  $2400 \text{ U mL}^{-1}$  para atividade enzimática em 48 horas de cultivo. Este resultado diferente ao obtido para os isolados APK 02, ALT 15 e ALT 16, pois o pico de atividade máxima ocorreu em 48 horas, além disso, a atividade enzimática encontrada por Corrêa (2009) e superior ao encontrado nas bactérias da reserva ecológica do CCET/UEG.

Thys (2004) estudando a produção de protease por *Microbacterium* sp. em meio suplementado com caseína detectou valores máximos de  $123 \text{ U mL}^{-1}$  após 24 horas de inoculo. Resultados estes inferiores aos encontrados no estudo das bactérias isoladas do CCET/UEG. Já a produção de protease por *Microbacterium* sp. em meio suplementado com extrato de levedura ( $348 \text{ U mL}^{-1}$ ) foi superior a encontrada para a mesma bactéria no meio com caseína (THYS, 2004). Deste modo, a produção de proteases pode variar conforme a

composição do meio, e esta deve ser definida com o objetivo de substituir os compostos caros por outros disponíveis em maior quantidade e de preço mais baixo como resíduos industriais (SCRIBAN et al., 1985). Estudos posteriores devem ser realizados com as bactérias isoladas no CCET/UEG variando a composição do meio de indução com a finalidade reduzir ainda mais o custo de produção.

Como foi detectada a atividade enzimática sobre a caseína do caldo leite nos ensaios anteriores com a diminuição e desaparecimento das bandas de proteínas no meio de cultivo, é possível inferir que as enzimas das bactérias APK 02, ALT 15 e ALT 16 sejam uma caseinase, porém é necessário identificar tanto a proteína como finalizar a determinação taxonômica dos isolados obtidos, a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA.

## CONCLUSÕES

- As três bactérias isoladas são Gram negativas, o que sugere que estas cepas são diferentes do principal gênero estudado (*Bacillus*) para produção enzimática.
- Os três isolados apresentam uma alta produção de proteases, porém a maior produção de protease (815,3 U mL<sup>-1</sup>) foi para o isolado ALT 15 obtida em 96 horas de fermentação em caldo leite.
- As Bactérias selecionadas produzem uma possível caseinase com um peso molecular de aproximadamente 20 kDa após 168 horas de fermentação em caldo leite.
- As bactérias APK 02, ALT 15 e ALT 16 são cepas que possuem uma grande capacidade de produção de caseínases com aplicação industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. D. D.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S; HORTA, C. C. R.; VICTÓRIA, J. M. N.; KALAPOTHAKIS, E. Survey of microbial enzymes in soil, water, and plant microenvironments. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 25-31, 2014.

ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa, Brasília, 1994. p. 21-43.

ARTURO, A.; ODELSOR, D. A.; HICHEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial Community Fingerprint of Amplified 16S and 16S-23S Ribosomal DNA gene Sequences and Restriction Endonuclease Analysis (ARDRA). Akkermans, **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-8, 1995.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The merops database as a peptidase information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, p. 95-102, 2001.

BEYNON, R. J. **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1996. 257p.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th. Ed. International Edition. W.H. Freeman and Company. New York. 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, L. F. **Caracterização Morfofisiológica e Genética de Bactérias Endofíticas Isoladas de Arroz (*Oryza sativa*)**. 2012, 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2012.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; VELHO, R. V.; BRANDELLI, A. Hydrolytic potential of a psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1479-1484, 2011.

DETTMER, A.; AYUB, M. A. Z.; GUTTERRES, M. Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 373-380, 2011.

FARREL-JUNIOR, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E; CREAMER, L. K. Nomenclature of the proteins of cow's milk - Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, L. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. In: SAID, S. R.; PIETRO, C. L. R. **Proteases: Características e aplicações industriais**. São Paulo: Editora Legis Summa. p. 327-339, 2004.

FRANKENA, J.; VAN, V.; STOUTHAMER, A. H. A continuous culture study of the exacellular protease in *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 169-176, 1985.

FRY, S. M.; HUANG, J. S.; MILHOLLAND, R. D. Isolation and Preliminary Characterization of Extracellular Proteases Produced by Strains of *Xylella fastidiosa* from Grapevines. **Biochemistry & Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 357-363, 1994.

GERMANO S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. Produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

HUANG, G. R.; YING, T. J.; HUO, P.; JIANG, J. X. Purification and characterization of a protease from Thermophilic *Bacillus* strain HS08. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2433-2438, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

JUNG, S. C.; PAIK, H.; KIM, M.S.; KAIK, K. S.; LEE, W. SEONG, C. N.; CHOI, S. K. InhA-like protease secreted by *Bacillus* sp. S17110 inhabited in turban shell. **Journal of Microbiology**, v. 45, p. 402-408, 2007.

KAMATH, S.; KAPATRAL, V.; CHAKRABARTY, A. M. Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 933-941, 1998.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimático**. São Paulo: vol. 3, Edgard Blucher Ltda, 2001, 593p.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. 2012. 116f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Alimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012.

MCALEECE, N.; GAGE, J. D. G.; LAMBSHEAD, P. J. D.; PATERSON, G. L. J. **Biodiversity professional statistics analysis software**. Jointly developed by Scottish Association for Marine and Natural History Museum London, 1997.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARQUES, F. M.; SÁ, J. F. O.; SANTOS, M. C.; MARTINS, M. F.; FURTADO, M. A. M. Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 473-479, 2011.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H. GOMES, E.; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília, p. 1-67, 2001.

MOREIRA, K. A.; SILVA, A. C. J.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L. **Estudos preliminares das propriedades cinética da protease alcalina de *Nocardiosis* sp.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília, DF, 2002.

NOVOZYMES. Disponível em: <<https://www.novozymes.com>> Acesso em 07 mar. 2013.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Promotoras de Crescimento em Milho (*Zea mays* L.)**. 2009 87f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal 2009.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; e REIS, V. M. Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de Brachiaria. **Documentos 117**, Embrapa, Planaltina: Distrito Federal, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 2, n. 1, p. 843-859, 1989.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1985. 489p.

SEVINC, N.; DEMIRKAN, E. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 5, n. 14, p. 95-103, 2011.

SHAHBAZI, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R. A novel low molecular weight extracellular protease from a moderately halophilic bacterium *Salinivibrio* sp. Strain MS-7: production and biochemical properties. **Molecular Biology Research Communications**, v. 1, n. 2, p. 45-56, 2012.

SHARAF, E. F.; EL-SAYED, W. S.; ABOSAIF, R. M. Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, p. 207-215, 2014.

SILVA-NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

STACKEBRANT, E. LIESACK, W.; GOEBEL, B. M. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, p. 232-236, 1993.

SWINNEN, I. A. M.; BERNAERTS, K.; DENS, E. J. J.; GEERAERD, A. H.; VAN IMPE, J. F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.

THYS, R. C. S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10**. 2004. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de Estirpes de Rizóbios por Sequenciamento Parcial dos Genes 16S rDNA nifH**. 2008. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIFY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 237-241, 2003.

WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: M. Moo-Young Editor, **Comprehensive Biotechnology**, v. 3, p. 789-818. 1985.

YU, P. J.; CHOU, C. C. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 283-288, 2005.

## ANEXO

**Tabela 6.** Análise morfológica das características de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em meio nutriente sólido a 30 °C, por 72 horas.

Isolados	Cresc.	Tam. (mm)	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Muco	Consistência	Det. óticos	Pigmentação
ANA 01	R	1,8	C	L	P	L	E	S	T	Cr
ANA 02	R	1,0	P	L	P	L	E	A	O	Cr
ANA 03	R	1,0	P	P	P	L	E	G	T	Cr
ANA 04	R	3,0	C	P	P	R	E	B	O	Cr
ANA 05	R	1,6	C	C	P	R	E	S	T	Cr
ANA 07	R	2,0	C	P	P	L	E	G	O	Cr
ANA 08	R	1,9	C	C	P	L	E	S	O	Cr
ANA 09	R	1,1	C	C	D	L	E	S	O	Cr
ANA 10	R	2,7	C	L	P	R	E	S	O	Cr
ANA 12	R	4,8	C	L	P	R	P	G	O	Cr
ANA 13	R	1,0	P	L	P	L	E	G	O	Am
ANA 14	R	2,1	C	L	P	R	E	S	O	Cr
ANA 15	R	3,6	C	L	P	L	P	G	O	Cr
ANA 16	R	3,0	C	P	P	L	E	S	O	Cr
ANA 17	R	2,8	C	C	O	R	E	B	O	Cr
ANA 19	R	2,3	C	L	P	P	E	B	O	Cr
ANA 21	R	1,9	C	C	P	L	E	B	O	Cr
ANA 22	R	3,2	C	P	P	L	E	G	T	Cr
ANA 23	R	1,0	P	C	P	R	E	S	O	Al
ANA 24	R	2,2	C	C	P	P	E	S	O	Cr
ANA 25	R	1,0	P	C	P	R	E	S	O	Al
ANA 26	R	2,2	C	C	P	L	P	G	O	Cr
ANA 27	R	1,2	C	L	P	R	E	A	O	Cr
ANA 28	R	1,0	P	P	P	L	E	G	O	Cr
ANA 29	R	2,6	C	L	O	L	E	G	T	Cr

Cresc. (tempo de crescimento das colônias) – MR: muito rápido, e R: rápido; Forma – I: irregular, C: circular, P: puntiforme; Elevação - P: plana, L: Lenticular, C: Convexa; Borda – P: Plana, O: ondulada, D: denteada; Superfície – L: lisa, R: rugosa, P: papilada; Muco – P:pouca, E: escassa, M: moderada, A: abundante; Consistência – G: gomosa, A: aquosa, S: seca, V: viscosa, B: butírica; Det. Óptico (Detalhe óptico) – Tr: transparente, T: translúcido, O: opaco; Pigmentação – Cr: creme, Am: amarela, Al: alaranjada, R: rosa.

**Cont. Tabela 6.** Análise morfológica das características de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em meio nutriente sólido a 30 °C, por 72 horas.

<b>Isolados</b>	<b>Cresc.</b>	<b>Tam. (mm)</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Borda</b>	<b>Superfície</b>	<b>Muco</b>	<b>Consistência</b>	<b>Det. óticos</b>	<b>Pigmentação</b>
ANA 30	R	4,1	I	P	O	R	E	G	O	Cr
ANA 32	R	3,8	C	C	P	R	P	G	O	Cr
ANA 33	R	4,3	C	C	P	L	M	G	O	Cr
ANA 34	R	1,8	C	L	P	L	E	G	T	Cr
ANA 36	R	2,8	C	P	D	L	E	B	O	Cr
ANA 38	R	1,5	C	L	P	L	E	S	O	Cr
ANA 39	R	3,4	C	L	P	L	E	B	O	Cr
ANA 40	R	1,6	C	C	P	L	E	S	O	Cr
ANA 42	R	5,2	C	C	P	R	M	B	O	Cr
ANA 43	R	2,1	C	P	P	L	E	S	O	Cr
ANA 45	R	4,0	C	C	P	L	M	B	O	Cr
ANA 48	R	5,0	C	P	P	R	P	B	O	Cr
APK 01	R	5,5	C	P	P	L	P	G	O	Cr
APK 02	R	4,7	C	P	P	L	P	B	O	Cr
APK 03	R	5,6	C	P	P	L	P	B	O	Cr
APK 06	R	4,2	C	P	P	L	P	G	O	Cr
APK 08	R	3,8	C	P	P	L	P	G	O	Cr
APK 09	R	4,2	C	P	P	L	P	B	O	Cr
APK 10	R	5,6	C	P	P	L	P	V	O	Cr
APK 11	R	4,9	C	P	P	L	P	B	O	Cr
APK 12	R	2,6	C	P	P	L	E	B	O	Cr
ALI 02	R	1,4	C	C	P	R	E	S	O	Am
ALI 03	R	1,2	C	C	P	L	E	S	O	Cr
ALI 04	R	1,5	C	C	P	L	E	S	O	Am
ALI 05	R	7,0	C	P	P	L	P	V	O	Cr
ALI 06	R	2,4	C	L	P	R	E	S	O	Am

Cresc. (tempo de crescimento das colônias) – MR: muito rápido, e R: rápido; Forma – I: irregular, C: circular, P: puntiforme; Elevação - P: plana, L: Lenticular, C: Convexa; Borda – P: Plana, O: ondulada, D: denteada; Superfície – L: lisa, R: rugosa, P: papilada; Muco – P:pouca, E: escassa, M: moderada, A: abundante; Consistência – G: gomosa, A: aquosa, S: seca, V: viscosa, B: butírica; Det. Óptico (Detalhe óptico) – Tr: transparente, T: translúcido, O: opaco; Pigmentação – Cr: creme, Am: amarela, Al: alaranjada, R: rosa.

**Cont. Tabela 6.** Análise morfológica das características de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, a partir das colônias crescidas em meio nutriente sólido a 30 °C, por 72 horas.

<b>Isolados</b>	<b>Cresc.</b>	<b>Tam. (mm)</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Borda</b>	<b>Superfície</b>	<b>Muco</b>	<b>Consistência</b>	<b>Det. óticos</b>	<b>Pigmentação</b>
<b>ALI 08</b>	R	1,2	C	C	P	L	E	S	O	Cr
<b>ALT 01</b>	R	3,9	C	P	P	L	P	V	O	Cr
<b>ALT 02</b>	R	4,4	C	P	P	L	M	V	O	Cr
<b>ALT 03</b>	R	2,7	C	P	P	L	P	G	O	Cr
<b>ALT 04</b>	R	1,9	C	L	P	L	P	V	O	Cr
<b>ALT 05</b>	R	2,2	C	P	P	R	E	B	O	Cr
<b>ALT 06</b>	R	2,3	I	P	O	L	E	V	O	Cr
<b>ALT 07</b>	R	3,2	C	P	P	L	P	G	O	Cr
<b>ALT 08</b>	R	3,2	C	P	P	L	P	A	O	Cr
<b>ALT 09</b>	R	2,2	C	L	P	L	P	V	O	Cr
<b>ALT 10</b>	R	4,0	C	P	P	L	P	B	O	Cr
<b>ALT 11</b>	R	3,6	C	P	P	L	P	V	O	Cr
<b>ALT 12</b>	R	5,6	C	P	P	L	P	V	O	Cr
<b>ALT 13</b>	R	1,1	C	L	P	L	E	S	O	Cr
<b>ALT 14</b>	R	1,1	C	L	P	L	E	S	O	Cr
<b>ALT 15</b>	R	4,1	C	P	P	L	P	G	O	Cr
<b>ALT 16</b>	R	4,1	C	P	P	L	P	G	O	Cr
<b>ACT 02</b>	R	3,0	C	L	P	L	E	B	O	R
<b>ACT 04</b>	R	1,7	C	L	P	R	E	S	O	Cr
<b>ACT 09</b>	R	1,7	C	C	P	L	E	S	O	Cr
<b>ACT 10</b>	R	0,7	P	L	P	L	E	A	Tr	Cr
<b>ACT 12</b>	R	2,0	C	P	P	L	A	G	O	Am

Cresc. (tempo de crescimento das colônias) – MR: muito rápido, e R: rápido; Forma – I: irregular, C: circular, P: puntiforme; Elevação - P: plana, L: Lenticular, C: Convexa; Borda – P: Plana, O: ondulada, D: denteada; Superfície – L: lisa, R: rugosa, P: papilada; Muco – P:pouca, E: escassa, M: moderada, A: abundante; Consistência – G: gomosa, A: aquosa, S: seca, V: viscosa, B: butírica; Det. Óptico (Detalhe óptico) – Tr: transparente, T: translúcido, O: opaco; Pigmentação – Cr: creme, Am: amarela, Al: alaranjada, R: rosa.

**Tabela 7.** Produção de enzimas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, avaliados pelo índice de solubilização (IS), índice enzimático (IE) e pela capacidade de crescimento em meio NFB.

Isolados	Meio NBRI-P			Meio Pikovskaya's			Meio Tween			Meio CMC			Meio Leite			Meio NFB
	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Form. de película
ANA 01	S	1,30	0,03	S	1,42	0,18	S	1,47	0,19	S	2,88	0,01	S	-	-	S
ANA 02	S	1,22	0,04	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N	-	-	N
ANA 03	S	1,24	0,13	S	-	-	N	-	-	S	-	-	N	-	-	N
ANA 04	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,75	0,05	N
ANA 05	S	-	-	S	1,50	0,14	S	1,33	0,10	S	1,91	0,01	S	1,27	0,06	N
ANA 07	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,55	0,01	N
ANA 08	S	-	-	S	1,42	0,08	S	1,33	0,12	S	2,47	0,03	S	1,27	0,06	S
ANA 09	S	-	-	S	1,35	0,03	S	1,57	0,07	S	-	-	S	-	-	N
ANA 10	S	-	-	S	1,35	0,04	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 12	S	1,21	0,02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,19	0,01	S
ANA 13	S	1,44	0,03	S	-	-	S	-	-	S	3,25	0,04	S	1,76	0,09	S
ANA 14	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,73	0,02	N
ANA 15	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,22	0,01	S
ANA 16	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,52	0,03	N
ANA 17	N	-	-	N	-	-	N	-	-	N	-	-	N	-	-	N
ANA 19	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
ANA 21	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 22	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 23	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 24	S	-	-	S	2,09	0,06	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 25	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 26	S	1,20	0,13	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
ANA 27	S	1,13	0,07	S	1,45	0,11	S	-	-	S	-	-	S	1,20	0,04	S
ANA 28	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 29	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	-	-	S	-	-	S
ANA 30	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,36	0,08	N
ANA 32	S	1,17	0,02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,26	0,10	S

S: sim, N: não.

**Cont. Tabela 7.** Produção de enzimas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, avaliados pelo índice de solubilização (IS), índice enzimático (IE) e pela capacidade de crescimento em meio NFB.

Isolados	Meio NBRI-P			Meio Pikovskaya's			Meio Tween			Meio CMC			Meio Leite			Meio NFB
	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Form. de película
ANA 33	S	1,10	0,02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,28	0,08	S
ANA 34	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 36	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 38	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 39	S	1,37	0,03	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	1,97	0,19	N
ANA 40	S	-	-	S	1,46	0,10	S	1,25	0,09	S	-	-	S	-	-	N
ANA 42	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,24	0,09	S
ANA 43	S	-	-	S	-	-	N	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ANA 45	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,92	0,04	S
ANA 48	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,55	0,04	S
APK 01	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,41	0,05	S
APK 02	S	1,19	0,03	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	2,02	0,09	S
APK 03	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,90	0,02	S
APK 06	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,98	0,08	S
APK 08	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,21	0,05	S
APK 09	S	1,15	0,08	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,73	0,04	S
APK 10	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,79	0,05	S
APK 11	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,74	0,06	S
APK 12	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	3,82	0,05	S	1,27	0,04	S
ALI 02	S	1,19	0,07	S	-	-	S	2,52	0,16	S	1,92	0,01	S	-	-	N
ALI 03	S	-	-	S	1,73	0,21	S	1,61	0,06	S	2,41	0,01	S	-	-	N
ALI 04	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	2,22	0,01	S	-	-	N
ALI 05	S	1,20	0,03	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,85	0,19	N
ALI 06	S	-	-	S	-	-	S	1,72	0,08	S	2,86	0,09	S	-	-	N
ALI 08	S	-	-	S	1,71	0,11	S	2,03	0,08	S	2,69	0,04	S	1,26	0,09	N

S: sim, N: não.

**Cont. Tabela 7.** Produção de enzimas de 73 isolados do solo da reserva ecológica do CCET/UEG, avaliados pelo índice de solubilização (IS), índice enzimático (IE) e pela capacidade de crescimento em meio NFB.

Isolados	Meio NBRI-P			Meio Pikovskaya's			Meio Tween			Meio CMC			Meio Leite			Meio NFB
	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.S.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Cresc.	I.E.	Desv. pad.	Form. de película
ALT 01	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 03	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,58	0,03	N
ALT 04	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 05	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 06	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	3,44	0,06	S	-	-	N
ALT 07	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,72	0,10	N
ALT 08	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,47	0,07	N
ALT 09	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 10	S	1,15	0,02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,74	0,19	N
ALT 11	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ALT 12	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,82	0,16	N
ALT 13	S	-	-	S	-	-	S	1,38	0,07	S	-	-	S	-	-	N
ALT 14	S	-	-	S	1,41	0,09	S	2,36	0,11	S	2,10	0,03	S	-	-	N
ALT 15	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	2,10	0,10	S
ALT 16	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	2,07	0,01	S
ACT 02	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ACT 04	S	-	-	S	1,55	0,07	S	2,07	0,15	S	2,35	0,00	S	1,21	0,03	N
ACT 09	S	-	-	S	1,36	0,04	S	2,89	0,16	S	-	-	S	-	-	N
ACT 10	S	-	-	S	1,48	0,11	S	-	-	S	-	-	S	-	-	N
ACT 12	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	1,43	0,07	N

S: sim, N: não.

***Meios de Cultura, Reagentes e Soluções.****Solução de Ágar*

1. Ágar -----18,0 g
2. Água -----800,0 mL

*Solução de Sais*

1. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-----30,0 g
2. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-----15,0 g
3. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-----2,5 g
4. NaCl-----2,5g
5. Água -----q.s.p. 1 L

*Meio Leite Sólido*

1. Solução MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M-----1,0 mL
2. Solução de Sais-----200,0 mL
3. Solução de Leite (20%) -----200,0 mL
4. Solução de Ágar-----800,0 mL
5. pH -----7,0

*Caldo Leite*

1. Solução MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M-----1,0 mL
2. Solução de Sais-----200,0 mL
3. Leite em Pó-----10,0 g
4. Água-----800,0 mL
5. pH -----7,0

*Meio Carboximetilcelulose (CMC) Sólido*

1. MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M -----1,0 mL
2. Solução de Sais-----200,0 mL
3. Solução de CMC (6%) -----200,0 mL
4. Solução de Ágar-----800,0 mL
5. pH -----7,0

*Meio Tween Sólido*

	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1M -----	1,0 mL
2.	Solução de Sais-----	200,0 mL
3.	Tween 80 -----	10,0 mL
4.	Solução de Ágar-----	800,0 mL
5.	pH -----	7,0

*Meio Pikovskaya's (PIKOVSKAYA, 1948)*

1.	Extrato de levedura-----	0,5 g
2.	Glicose -----	10,0 g
3.	Ca <sub>3</sub> (PO) <sub>4</sub> -----	5,0 g
4.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	0,5 g
5.	KCl-----	0,2 g
6.	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,1 g
7.	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O-----	0,0001 g
8.	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,0001 g
9.	Água -----	q.s.p. 1L
10.	Ágar -----	15,0 g
11.	pH -----	7,0

*Caldo Nutriente*

1.	Extrato de Carne -----	3,0 g
2.	Peptona-----	5,0 g
3.	Glicose-----	2,5 g
4.	pH -----	7,0
5.	Água -----	q.s.p. 1L

*Meio Nutriente Sólido / Nutriente Ágar*

1.	Extrato de Carne -----	3,0 g
2.	Peptona-----	5,0 g
3.	Glicose-----	2,5 g
4.	pH -----	7,0
5.	Ágar -----	15,0 g
6.	Água -----	q.s.p. 1L
7.	pH -----	7,0

*Meio BDA Act Sólido*

1. Batata -----200,0 g
2. Glicose (Açúcar Cristal)-----20,0 g

Coloque as batatas cortadas em rodela em um béquer;

Adicione água destilada até cobrir as batatas;

Cozinhe as batatas em micro-ondas até elas derreterem;

Filtre a mistura em papel de filtro ou gaze com algodão;

Dissolva a glicose;

Complete o volume para 1000 mL, acrescente 15 gramas de ágar e autoclave.

Após autoclavar espere o meio diminuir a temperatura e acrescente:

200 uL de cloranfenicol 100 mg/mL;

100 uL de ampicilina 100 mg/mL;

300 uL de cetoconazol 20 mg/ mL.

Para cada 200 mL de meio.

*Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)*

1. Glicose -----10,0 g
2.  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -----5,0 g
3.  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  -----5,0 g
4. KCl-----0,2 g
5.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -----0,25 g
6.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -----0,1 g
7. Água -----q.s.p. 1L
8. Ágar -----15,0 g
9. pH -----7,0