



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLA PIZZAIA PRETTI

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
HIDROLASES EM SOLO ATRAVÉS DA ESTRATÉGIA DE
ENRIQUECIMENTO SELETIVO**

Londrina
2014

CARLA PIZZAIA PRETTI

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
HIDROLASES EM SOLO ATRAVÉS DA ESTRATÉGIA DE
ENRIQUECIMENTO SELETIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pretti, Carla.

Prospecção de Bactérias Produtoras de Hidrolases em Solo Através da Estratégia de Enriquecimento Seletivo / Carla Pretti. - Londrina, 2014.
128 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Coorientador: Mara Lúcia Ribeiro .

Coorientador: Elisete Pains Rodrigues .

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Produção de Enzimas por Micro-organismos em Solo - Tese. I. Luiz Martinez de Oliveira, André . II. Ribeiro , Mara Lúcia . III. Pains Rodrigues , Elisete . IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título.

CDU 66

CARLA PIZZAIA PRETTI

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROLASES
EM SOLO ATRAVÉS DA ESTRATÉGIA DE ENRIQUECIMENTO
SELETIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Mara Lúcia Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de Fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Este mestrado marca uma etapa de muitos anseios e dificuldades em minha vida, mas sem dúvidas marca também uma etapa de realizações e aprendizagens que vão além do âmbito acadêmico. Atribuo a finalização deste trabalho como resultado de muita persistência, persistência esta, sustentada por todos que estiveram ao meu lado. Desta forma, não posso deixar de expressar minha sincera gratidão.

Primeiramente a Deus, por me manter sob sua proteção, por me amparar e me guiar sempre para os melhores caminhos e escolhas.

A minha família, meu maior tesouro, pelo amor incondicional e por todos os valores que me fazem buscar ser uma pessoa melhor todos os dias.

Minha gratidão especial ao orientador professor André Luiz Martinez de Oliveira, que me acolheu durante esses anos com muita compreensão e paciência. Vou ser eternamente grata por ter acreditado em mim e não ter me deixado desistir. Ao senhor, minha parabenização pelo profissional e pela pessoa que é. Espero, dentro das minhas limitações, ter retribuído tamanha confiança depositada.

A professora Maria Inês Rezende e professora Fabiana Guillen Moreira Gasparin pela amizade e contribuições para minha banca de qualificação.

Aos meus companheiros, confidentes nesta trajetória, Natália Pagiatto e Mauro Capello Papi, com os quais compartilhei todos os meus momentos, meus anseios. Sem dúvidas, vocês fizeram os meus dias na UEL melhores.

Aos meus amigos por muitas vezes compreender meus momentos de renúncia, minha ausência.

A Universidade Estadual de Londrina, por ter feito parte da minha vida por 6 anos, me proporcionando uma graduação e agora pós graduação. Aqui recebi meus maiores e melhores ensinamentos, que me permitem hoje um futuro promissor.

A persistência é o melhor caminho para o êxito.

(Charles Chaplin)

PRETTI, Carla Pizzaia. **Prospecção de Bactérias Produtoras de Hidrolases em Solo Através da Estratégia de Enriquecimento Seletivo**. 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A abundância de micro-organismos existentes no solo e a variedade de enzimas e ramos de aplicação para as mesmas justificam e incentivam hoje a busca neste ambiente, por novos isolados produtores de enzimas com características desejáveis em biocatálise, havendo um grande interesse particularmente por isolados bacterianos. Estratégias vêm sendo desenvolvidas visando à prospecção e o reconhecimento de micro-organismos ditos elite, os quais possam se destacar no mercado biotecnológico por propriedades como suscetibilidade à manipulação genética ou ambiental, diversidade metabólica e crescimento em meios de baixo custo. O enriquecimento orgânico de solos vem sendo principalmente associado a propriedades desejáveis a esse ambiente, mas pode ainda ser caracterizado por afetar a composição e diversidade das populações microbianas presentes, podendo portanto, ser uma ferramenta aliada à prospecção de micro-organismos específicos. A abordagem proposta neste trabalho baseia-se no conceito de enriquecimento orgânico seletivo, ou seja, a adição de um dado material em solo estimula somente os micro-organismos e as enzimas capazes de degradá-lo, tendo pouco ou nenhum efeito sobre outros. O presente estudo experimentou dois solos representativos de diferentes tipos de uso (agrícola e sob Pousio) e empregou três diferentes materiais orgânicos (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e farelo de crisálida) visando a prospecção e o isolamento de bactérias elite produtoras das enzimas celulase, protease e quitinase, respectivamente. Para avaliação dos efeitos da adição desses materiais aos solos, foi utilizado o parâmetro monitoramento enzimático, o qual vem ganhando espaço nos programas de avaliação de solos e na análise da diversidade funcional das comunidades microbianas neste ambiente. Para ambos os solos, a adição dos materiais selecionados promoveu melhoria na atividade microbiana, evidenciada tanto pelo aumento nos níveis de atividade enzimática, como pelo alto número de isolados obtidos. Foi possível também obter um alto percentual de micro-organismos considerados celulolíticos, proteolíticos e quitinolíticos, o que confirma o papel dos materiais selecionados, não só na obtenção de um maior número de isolados, mas principalmente na obtenção dos grupos bacterianos de interesse, caracterizando assim a eficiência da estratégia de enriquecimento seletivo proposta neste trabalho.

Palavras-chave: Solo. Enzimas. Enriquecimento Seletivo.

PRETTI, Carla Pizzaia. **Prospecting Hidrolases Producing Bacteria in Soil Through Selective Enrichment Strategy**. 2014. 128 p. Dissertation (Master's Degree Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The abundance of existing micro-organisms in the soil and the variety of enzymes and ways of application to the same, justify and encourage today the search in this environment, by new isolates producing enzymes with desirable characteristics for biocatalysis, with a great interest particularly by bacterial isolates. Strategies have been developed aiming at prospecting and recognition of micro-organisms said elite, which can stand out in the biotechnological market by properties as susceptibility to genetic or environmental manipulation, metabolic diversity and growth in media of low cost. The organic enrichment of soils has been mainly associated with desirable properties in this environment, but can still be characterized by affecting the composition and diversity of microbial populations present and may therefore be a tool coupled with the exploration of specific micro-organisms. The approach proposed in this paper is based on the concept of selective organic enrichment, in other words, the addition of a specific material in soil stimulates only the micro-organisms and enzymes capable of degrading it, with little or no effect on others. The present study experienced two representative soils of different types of uses (agricultural and under fallow) and employed three different organic materials (bagasse sugarcane, soybean bran and chrysalis bran) aiming at prospecting and isolation of elite bacteria producing of cellulase, protease and chitinase, respectively. To evaluate the effects of adding these materials to soils, the enzymatic monitoring parameter was used, which is gaining ground in the soils evaluation programs and in the analysis of functional diversity of microbial communities in this environment. For both soils, the addition of selected materials promoted improvement in microbial activity evidenced both by increased levels of enzyme activity, as the high number of isolates obtained. It was also possible to obtain a high percentage of cellulolytic, proteolytic and chitinolytic micro-organisms, which confirms the role of materials selected, not only in obtaining a large number of isolates, but mainly in obtaining bacterial groups of interest, demonstrating the efficiency of the selective enrichment strategy proposed in this paper.

Key words: Soil. Enzyme. Selective Enrichment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Enzima extracelular fisicamente protegida por colóides do solo	24
Figura 2	Dinâmica da atividade enzimática em solos.....	28
Figura 3	Representação parcial da estrutura química da celulose.....	37
Figura 4	Representação parcial da estrutura química da quitina	43
Figura 5	Fluxograma representativo da metodologia aplicada para a prospecção de bactérias produtoras de hidrolase em solo	50
Figura 6	Monitoramento da atividade celulolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pousio (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar (BC) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C)...	63
Figura 7	Efeito do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pousio na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C	69
Figura 8	Halo de solubilização característico dos isolados bacterianos que apresentaram atividade celulolítica	72
Figura 9	Monitoramento da atividade proteolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pousio (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor farelo de soja (FS) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C).....	77
Figura 10	Efeito do substrato indutor farelo de soja no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pousio na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C.....	81
Figura 11	Halo de solubilização característico dos isolados bacterianos que apresentaram atividade proteolítica	83

- Figura 12** Monitoramento da atividade quitinolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pousio (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor farelo de crisálida (FC) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C)87
- Figura 13** Efeito do substrato indutor farelo de crisálida no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI FC sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pousio na ausência e presença de SI FC sob temperatura de 28°C e 58°C90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais gêneros bacterianos componentes da diversidade microbiana em solos	23
Tabela 2	Seleção e procedência dos Substratos Indutores (SI) de acordo com os objetivos propostos	48
Tabela 3	Descrição dos microcosmos montados para avaliar o efeito da adição de diferentes substratos indutores e da temperatura de incubação sobre a composição quali-quantitativa da comunidade microbiana nativa de solo agrícola e solo sob Pousio	51
Tabela 4	Descrição das avaliações qualitativas aplicadas aos isolados bacterianos conforme microcosmo de enriquecimento seletivo de origem	58
Tabela 5	Características químicas dos solos experimentais.....	61
Tabela 6	Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de celulase	68
Tabela 7	Efeito do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar no percentual de isolados bacterianos celulolíticos obtidos em microcosmos montados a partir de solo agrícola e solo sob pousio na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C	73
Tabela 8	Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de protease	80
Tabela 9	Efeito do substrato indutor farelo de soja no percentual de isolados bacterianos proteolíticos obtidos em microcosmos montados a partir de solo agrícola e solo sob pousio na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C ..	84
Tabela 10	Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de quitinase.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/I	Ausência de Isolados
Al	Alumínio
BC	Bagaço de Cana-de-Açúcar
c	Concentração
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
cmolc/dm ³	Centimol de Carga por Decímetro Cúbico
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de Cobre Penta-hidratado
d	Fator Diluição
DMBA	4-(Dimetilamino)benzaldeído
FC	Farelo de Crisálida
FS	Farelo de Soja
FeCl ₃	Cloreto de Ferro
g	Gramma
g-1	Por Gramma
h	Hora
h-1	Por Hora
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O	Água
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Kilograma
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
m	Metro
M	Molar
Mg	Magnésio

MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/m	Razão Massa/Massa (g/g)
mM	Milimolar
MM	Meio Mínimo
MO	Matéria Orgânica
N/A	Não Aplicável
N/D	Não Detectado
N/E	Não Esperado
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Dibásico
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de Sódio Monobásico Monoidratado
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Fosfato de Sódio Dibásico Diidratado
NaN ₃	Azida de Sódio
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
nm	Nanômetro
P	Fósforo
pseco	Peso Seco
PA	Grau Analítico
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
SI	Substrato Indutor
t	Tempo (Dias)
T	Temperatura (°C)
TCA	Ácido Tricloroacético
UV/Vis	Ultra Violeta Visível
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

v	Volume
v/m	Razão Volume/Massa (mL/g)
v/v	Razão Volume/Volume (mL/mL)
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	SOLOS	21
3.1.1	Diversidade Microbiana	21
3.1.2	Atividade Microbiana	23
3.2	ENZIMAS NO SOLO	24
3.2.1	Importância Ecológica E Biotecnológica	25
3.2.2	Regulação Da Atividade Enzimática	26
3.3	PAPEL DO ENRIQUECIMENTO ORGÂNICO NA DIVERSIDADE MICROBIANA E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SOLOS	28
3.4	PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM SOLOS	29
3.4.1	Potencial Biotecnológico	29
3.4.2	Isolamento De Micro-Organismos	29
3.5	ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO	31
3.5.1	Proteases	32
3.5.1.1	Proteases bacterianas.....	32
3.5.1.2	Aplicações	33
3.5.1.2.1	<i>Indústria de detergentes</i>	34
3.5.1.2.2	<i>Indústria de alimentos</i>	35
3.5.1.2.3	<i>Protease como agente de modificação de proteínas</i>	36
3.5.1.2.4	<i>Indústria farmacêutica</i>	36
3.5.1.2.5	<i>Indústria de couros</i>	36
3.5.1.2.6	<i>Recuperação da prata</i>	36
3.5.2	Celulases.....	37
3.5.2.1	Celulases bacterianas	38
3.5.2.2	Aplicações	39

3.5.2.2.1	<i>Hidrólise de materiais lignocelulósicos visando a produção de etanol</i>	40
3.5.2.2.2	<i>Indústria de alimentos</i>	40
3.5.2.2.3	<i>Indústria de polpa de celulose e papel</i>	41
3.5.2.2.4	<i>Indústria têxtil e lavanderia</i>	41
3.5.3	Quitinases	42
3.5.3.1	Quitinases bacterianas	42
3.5.3.2	Aplicações	43
3.5.3.2.1	<i>Controle biológico</i>	45
3.5.3.2.2	<i>Obtenção de quito-oligossacarídeos</i>	45
3.5.3.2.3	<i>Degradação de resíduos quitinosos</i>	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	MATERIAL	47
4.1.1	Reagentes	47
4.1.2	Solos	47
4.1.2.1	Seleção e procedência	47
4.1.2.2	Coleta e armazenamento	47
4.1.2.3	Caracterização química.....	48
4.1.3	Substratos Indutores (SI)	48
4.1.3.1	Seleção e procedência	48
4.1.3.2	Preparo e armazenamento.....	48
4.2	MÉTODOS	49
4.2.1	Adição de Substratos Indutores a Amostras de Solo Agrícola e Solo sob Pousio – Montagem de Microcosmos	49
4.2.2	Monitoramento da Atividade Enzimática em Amostras de Solo Agrícola e Solo sob Pousio na Presença e Ausência de Substrato Indutor (SI)	50
4.2.2.1	Monitoramento da atividade celulolítica	52
4.2.2.2	Monitoramento da atividade proteolítica.....	53
4.2.2.3	Monitoramento da atividade quitinolítica	55

4.2.4	Avaliação Qualitativa da Produção de Hidrolases pelos Isolados Bacterianos: Identificação de Bactérias com Potencial de Aplicação Biotecnológica.....	58
4.2.4.1	Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de celulase	59
4.2.4.2	Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de protease	59
4.2.4.3	Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de quitinase	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS.....	61
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA CELULOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSSO.....	62
5.2.1	Monitoramento da Atividade Celulolítica	62
5.2.2	Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota.....	67
5.2.3	Avaliação Qualitativa da Produção de Celulase.....	71
5.3	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR FARELO DE SOJA NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PROTEOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSSO.....	76
5.3.1	Monitoramento da Atividade Proteolítica.....	76
5.3.2	Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota.....	79
5.3.3	Avaliação Qualitativa da Produção de Protease	82
5.4	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR FARELO DE CRISÁLIDA NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA QUITINOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSSO.....	86
5.4.1	Monitoramento da Atividade Quitinolítica	86
5.4.2	Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota.....	88

6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
	APÊNDICES	113
	Apêndice 1 Substratos Indutores (SI)	113
	Apêndice 2 Representação da diversidade microbiana acessada ao longo da etapa de isolamento.....	113
	Apêndice 3 Resultados gerais das etapas de isolamento e avaliação qualitativa para os microcosmos montados a partir de solo agrícola e sob pousio na ausência e presença do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar.....	114
	Apêndice 4 Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	115
	Apêndice 5 Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	115
	Apêndice 6 Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo agrícola na ausência do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	115

Apêndice 7	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	115
Apêndice 8	Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na ausência do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	116
Apêndice 9	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.....	117
Apêndice 10	Resultados gerais das etapas de isolamento e avaliação qualitativa para os microcosmos montados a partir de solo agrícola e sob pousio na ausência e presença do substrato indutor farelo de soja.....	118
Apêndice 11	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	119
Apêndice 12	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram	

	quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	120
Apêndice 13	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na ausência do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	120
Apêndice 14	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	121
Apêndice 15	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	122
Apêndice 16	Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na ausência do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.....	122
ANEXOS		124
ANEXO A	Meios de Cultivo – Etapa de Isolamento	124
ANEXO B	Meios Sólidos – Etapa de Avaliação Qualitativa	125
ANEXO C	Principais Soluções	127

1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado o ecossistema mais complexo e heterogêneo existente, o que faz deste ambiente, um dos maiores reservatórios de biodiversidade, sendo, portanto, um importante recurso no âmbito biotecnológico, particularmente na busca de novos micro-organismos.

Estratégias de isolamento e seleção têm garantido a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis, os quais vêm se destacando principalmente pela suscetibilidade a manipulações ambientais e genéticas, podendo ser aproveitados como fonte de enzimas e outros metabólitos de interesse industrial e ambiental.

O mercado global de enzimas deverá alcançar 4,4 bilhões de dólares em 2015 (BINOD et al., 2013), sendo o crescimento impulsionado pela expansão nas possibilidades de aplicação e também pela repressão ambiental rigorosa frente aos produtos e processos químicos convencionais existentes.

A abundância de micro-organismos existentes no solo e a variedade de enzimas e ramos de aplicação para as mesmas justificam e incentivam o isolamento e *screening* de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise. Esta prática antiga de buscar na natureza recursos bioquímicos ou genéticos para o desenvolvimento de novos produtos e processos é descrita agora por um novo termo: “bioprospecção ou prospecção da biodiversidade”.

Espera-se neste trabalho, formar uma coleção de isolados bacterianos produtores de hidrolases de alto interesse biotecnológico (celulases, proteases e quitinases), empregando uma estratégia ambiental de enriquecimento seletivo em solos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir modificação quali-quantitativa na composição da comunidade microbiana nativa do solo através da introdução de substratos orgânicos (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e farelo de crisálida) visando a prospecção de isolados bacterianos produtores de hidrolases candidatos a aplicações biotecnológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adicionar substratos indutores em amostras de solo visando o seu enriquecimento com bactérias mesofílicas e termofílicas com atividade hidrolítica seletiva para o substrato adicionado.

- Avaliar o impacto da adição dos diferentes substratos indutores selecionados sobre a atividade enzimática do solo e sobre a estimulação das populações microbianas presentes.

- Realizar o isolamento de micro-organismos a partir das amostras de solo nas condições de enriquecimento específicas empregadas.

- Avaliar qualitativamente a produção das enzimas hidrolíticas (celulase, protease e quitinase) pelos isolados bacterianos obtidos a partir das amostras de solo nas condições de enriquecimento específicas empregadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOLOS

O solo é um ambiente heterogêneo altamente complexo, geralmente carente de nutrientes e recursos energéticos, composto por fases sólida, líquida e gasosa, caracterizado por uma variedade de processos químicos, físicos e biológicos. Micro-organismos, juntamente com suas enzimas extracelulares, e com a meso e macrofauna do solo, conduzem todas as reações metabólicas conhecidas neste ambiente (DUARTE et al., 2009; BAKSHI; VARMA, 2011; KUJUR; GARTIA; PATEL, 2012). Estas atividades ocorrem ainda de maneira heterogênea, existindo microhabitats denominados de hot spots com elevada atividade biológica, que ocorrem pelo acúmulo de matéria orgânica particulada, dejetos animais, e deposições rizosféricas. Estes microhabitats são sistemas dinâmicos, e apresentam grandes diferenças espaçotemporais (GONZALEZ et al., 2012).

Na fase líquida encontram-se em suspensão elementos químicos e moléculas solúveis; a fração gasosa é formada pela modificação do ar atmosférico decorrente de processos bioquímicos como a respiração, já a fração sólida é composta por substâncias inorgânicas (areia, silte e argila) e materiais orgânicos (ácidos húmicos, ligninas, hemicelulose, celulose, amido, pectina, lignina, lipídeos, quitina etc.), em vários estágios de decomposição (ZILLI, 2003).

Esta última fração (sólida) representa em média 50 % do volume total do solo, sendo cerca de 45 % representados por minerais e entre 1 - 5 % representados por matéria orgânica, incluindo organismos vivos (raízes, macro e micro-organismos) (GONÇALVES, 2011).

3.1.1 Diversidade Microbiana

Devido a sua heterogeneidade física, química e biológica, o solo é um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, sendo, portanto, um importante recurso para a exploração biotecnológica. A diversidade microbiana neste ambiente ultrapassa a de organismos eucariontes, podendo existir milhares de

diferentes espécies bacterianas em apenas 1 cm³ de solo (HUNTER-CEVERA, 1998; TORSVIK; OVREAS, 2002; MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011; NACKE, 2012).

Os micro-organismos que habitam o solo constituem a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, mantendo relações vitais entre si e com os organismos superiores. Realizam diversas funções importantes para a dinâmica funcional do solo, decompondo a matéria orgânica, liberando nutrientes em formas mais disponíveis às plantas, e degradando substâncias xenobióticas. Além disso, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação e agregação do solo (HUNTER-CEVERA, 1998; SCHLOTTER et al., 2003; KUJUR; GARTIA; PATEL, 2012).

Burns e colaboradores (2013) destacam a diversidade de micro-organismos em solos com números atualmente computados: população total entre 10⁸-10¹⁰ bactérias compreendendo entre 5000 a mais de um milhão de espécies por grama de solo. Estes micro-organismos podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos. Exemplos desses grupos são os micro-organismos envolvidos no ciclo do carbono e nitrogênio (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

Bakshi e Varma (2011) estabelecem que a fertilidade e qualidade de solos não esta relacionada somente com sua composição química, mas principalmente com a quantidade e diversidade dos micro-organismos que os habitam. Os autores citam ainda os principais gêneros bacterianos presentes em solos conforme Tabela 1.

Apesar de sermos capazes de apreciar a importância dos micro-organismos no solo, temos pouca informação sobre o papel da diversidade no funcionamento deste ambiente (STARK et al., 2008).

O acesso à diversidade microbiana em solos é uma tarefa altamente complexa. Estima-se que menos de 10 % dos microrganismos existentes nesses ambientes tenham sido caracterizados e descritos (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006).

Tabela 1 – Principais gêneros bacterianos componentes da diversidade microbiana em solos

Gêneros Bacterianos	
<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Coryne bacterium</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Aerobacter</i>

Fonte: Bakshi, Varma (2011)

3.1.2 Atividade Microbiana

A importância da biodiversidade para a funcionalidade de ecossistemas ocupa destaque há algum tempo. A agenda 21, documento elaborado durante a conferência da ONU sobre meio ambiente e desenvolvimento (Rio 92), buscava promover a cooperação científica internacional para melhor compreensão da importância da biodiversidade sobre a funcionalidade de ecossistemas.

O solo é um ambiente fundamentalmente insubstituível: atua sobre a produtividade vegetal, e governa os ciclos biogeoquímicos. Em ambas as atividades a microbiota do solo possui enorme influência, pelas interações com os vegetais (através de relações simbióticas, parasíticas, comensalísticas, por exemplo), e pelas ações sobre a ciclagem de praticamente todo composto orgânico (inclusive compostos xenobióticos). Desta maneira, de 80 a 90 % dos processos funcionais que ocorrem no ambiente do solo são mediados por microrganismos (NANNIPIERI et al., 2003). A importância da microbiota do solo sobre os processos funcionais que ali ocorrem refletem a versatilidade metabólica observada entre fungos e bactérias do solo.

A atividade microbiana em solos é regulada basicamente pelas condições nutricionais, temperatura e disponibilidade de água. Outros importantes fatores incluem estrutura, manejo do solo, acidez e oxigênio disponível. É fortemente influenciada pela presença de raízes e materiais orgânicos em decomposição (SCHLOTTER et al. 2003; ZILLI, 2003; GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013). De acordo com Ros e colaboradores (2006) a atividade assim como a abundância e diversidade microbiana tendem a diminuir com o aumento da profundidade em solos.

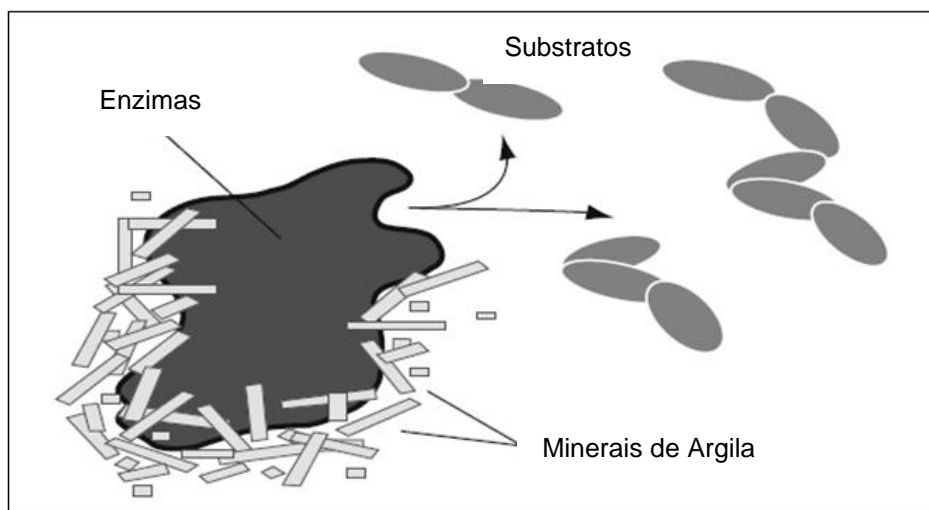
Nielsen e Winding (2002) descrevem os principais parâmetros utilizados para avaliação da atividade microbiana, qualidade, fertilidade e dinâmica de solos, dentre eles: Respiração (Quociente Metabólico), Índice de Decomposição de Matéria Orgânica e Atividade Enzimática.

3.2 ENZIMAS NO SOLO

As enzimas do solo estão presentes basicamente nas seguintes formas: intracelularmente ou associadas à superfície externa da célula de origem ou extracelularmente, podendo estar livre na solução do solo, adsorvida por argilas ou imobilizadas por moléculas húmicas (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; CENCIANI et al., 2011; SHI, 2011).

De acordo com Geisseler e Horwath (2009), minerais de argila e matéria orgânica parecem estabilizar e proteger enzimas extracelulares no solo, retardando sua degradação (Figura 1). Gianfreda e Ruggiero (2006) também destacam a resistência das enzimas neste ambiente contra a proteólise, desnaturação térmica e química. O mecanismo exato pelo qual as enzimas são imobilizadas e conseqüentemente, estabilizadas em solos não está completamente esclarecido.

Figura 1 – Enzima extracelular fisicamente protegida por colóides do solo



Fonte: Bakshi, Varma (2011)

3.2.1 Importância Ecológica e Biotecnológica

O número de enzimas presentes no solo é inestimável, sendo que pelo menos 500 devem ter papel crucial em ambos os ciclos de Carbono e Nitrogênio (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006). São predominantemente de origem microbiana (GRÉGGIO; NAHAS, 2007; CENCIANI et al.,2011; KUJUR; GARTIA; PATEL, 2012), sendo as extracelulares a primeira forma pela qual os micro-organismos degradam compostos orgânicos complexos em pequenas moléculas que possam ser assimiladas, e portanto, as principais mediadoras dos processos biológicos microbianos neste ambiente (ALLISON; VITOUSEK, 2005; MARX, 2005; WALLENSTEIN; WEINTRAUB, 2008; BALDRIAN, 2009; GEISSELER; HORWATH, 2009).

As enzimas presentes no solo participam em reações de adsorção, oxidação, redução, hidrólise e complexação (STARK et al. 2008; CENCIANI et al.,2011). Estão envolvidas na degradação de paredes celulares de micro-organismos e plantas, na geração de húmus, mineralização do nitrogênio, fósforo, enxofre entre outros elementos (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; ALLISON et al., 2007; BALDRIAN, 2009) bem como na estabilização das estruturas física e química do solo (STARK et al.,2008; RATH; MISHRA; MOHANTY, 2010).

Enquanto celulasas e quitinases estão entre as principais envolvidas na decomposição de matéria orgânica em solos (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; BAKSHI, VARMA, 2011; SHI, 2011) as proteases são certamente as principais responsáveis pela mineralização do nitrogênio (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008; SARDANS; PEÑUELAS; ESTIARTE, 2008; BAKSHI; VARMA, 2011; BRZOSTEK; FINZI, 2011).

São sugeridas diversas razões biotecnológicas para avaliação das enzimas do solo: podem ser utilizadas como informativo do potencial bioquímico e como indicadoras da qualidade (NIELSEN; WINDING, 2002; SAJJAD; LODHI; AZAM, 2002; CALDWELL, 2005; BALDRIAN, 2009; ALOTAIBE; SCHOENAU, 2011; CORDEIRO; CORÁ; NAHAS, 2012; KUJUR; GARTIA; PATEL, 2012). A atividade enzimática do solo pode ser utilizada também como parâmetro de avaliação dos efeitos da adição de resíduos ao solo (SAJJAD; LODHI; AZAM, 2002; CAYUELA; SINICCO; MONDINI 2009; SINEGANI; MAHOHI, 2010; CENCIANI et al., 2011;

PRADEEP; NARASIMHA, 2011) e como medida da disponibilidade nutricional neste ambiente (TEJADA; HERNANDEZ; GARCIA, 2006; CAYUELA; SINICCO; MONDINI 2009; SHI, 2011), respondendo mais rapidamente a perturbações do que outros parâmetros disponíveis (CHANG; CHUNG; TSAI, 2007; BAKSHI; VARMA, 2011).

Wick et al. (2002) em estudo com diferentes solos, verificaram que os parâmetros utilizados, entre eles a quantificação da enzima protease, foram indicadores sensíveis na avaliação da qualidade do solo. Caldwell (2005), Baldrian (2009) e Cordeiro, Corá, Nahas (2012) destacam o monitoramento enzimático como ferramenta útil na avaliação da diversidade funcional das comunidades microbianas do solo. Dentre os países europeus que adotam comumente o monitoramento enzimático nos programas de avaliação de solos, está a República Tcheca e Áustria (NIELSEN; WINDING, 2002).

3.2.2 Regulação da Atividade Enzimática

A atividade de qualquer enzima no solo é resultado da sua persistência, estabilização, regulação e comportamento catalítico (Figura 2). Estes processos estão dinamicamente interligados e são influenciados por alterações nas características físicas, químicas e biológicas do solo (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006).

Fatores como pH, temperatura, estrutura do solo (PAVEL; DOYLE; STEINBERGER, 2004; GIANFREDA; RUGGIERO, 2006), teor de dióxido de carbono atmosférico (BURNS et al., 2013) e teor de C e N (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006) influenciam diretamente a atividade enzimática em solo. Estão ainda, positivamente relacionadas com o teor de matéria orgânica (GRÉGGIO; NAHAS, 2007; SHI, 2011).

Conforme Shackle, Freeman, Reynolds (2000), três fatores principais atuam quantitativamente sobre a disponibilidade de enzimas ativas no solo: presença de substratos apropriados para os micro-organismos presentes, crescimento/aumento da população microbiana, ou ainda, enzimas extracelulares inicialmente imobilizadas tornam-se ativas.

A quantidade de enzimas ativas disponíveis deve diminuir quando nutrientes simples estão presentes e deve ser estimulada pela presença dos substratos complexos os quais degradam (ALLISON; VITOUSEK, 2005; GEISSELER; HORWATH 2009; HERNÁNDEZ; HOBBIE, 2010; SHI, 2011).

Conforme Burns (2013), em geral, aumentos na temperatura do solo tendem a aumentar a atividade enzimática. O efeito mais imediato de um aumento na temperatura do solo sobre a atividade enzimática é o de acelerar a velocidade com a qual enzimas e substratos colidem para formação do complexo enzima-substrato (BRZOSTEK E FINZI, 2011).

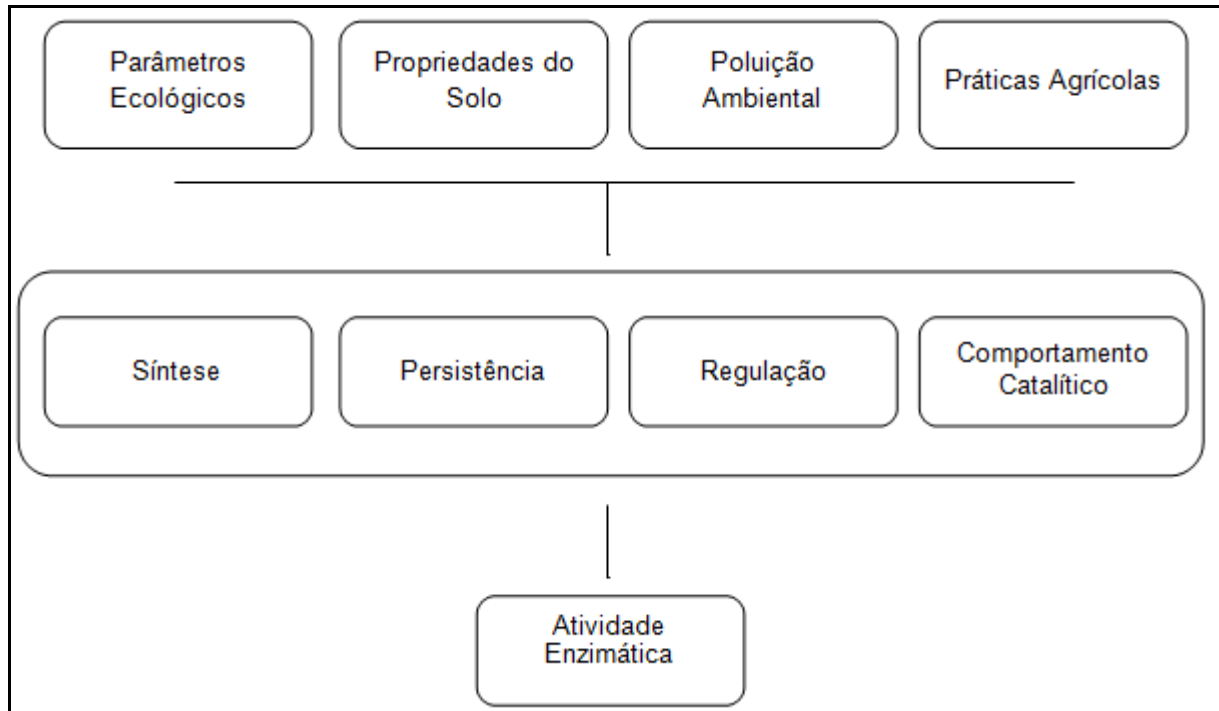
Enzimas hidrolíticas do solo apresentam temperatura ótima de 10 a 15 °C acima do que aquelas observadas em solução, o que pode ser atribuído ao fato de estarem geralmente protegidas por coloides (TRASAR-CEPEDA; GIL-SOTRES; LEIRÓS, 2007).

Difícilmente se observa a ação de um único fator sobre a atividade enzimática do solo em um ambiente natural. Desta forma, o estudo de qualquer enzima do solo sob influência de uma única fonte de variação pode levar a estimativas inadequadas de sua atividade (DIELEMAN et al., 2012).

Assim como a atividade e diversidade microbiana, as atividades enzimáticas geralmente decrescem com a profundidade do solo (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; GRÉGGIO; NAHAS, 2007). Facci (2008), por exemplo, encontrou maior atividade celulolítica na camada superficial do solo (0-10 cm) em relação a outras camadas. A mesma profundidade foi apontada por Silva e Melo (2004) como sendo a de maior atividade proteolítica e por Rodríguez-Kábana e colaboradores (1983) como sendo a de maior atividade quitinolítica.

Burns et al. (2013) e Gianfreda e Ruggiero (2006) apresentam revisão completa sobre os fatores determinantes na atividade enzimática em solos.

Figura 2 – Dinâmica da atividade enzimática em solos



Fonte: Adaptado de Gianfreda e Ruggiero (2006)

3.3 PAPEL DO ENRIQUECIMENTO ORGÂNICO NA DIVERSIDADE MICROBIANA E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SOLOS

O enriquecimento de solos com material orgânico tem sido associado a propriedades desejáveis, como alta capacidade de retenção de água, menor compactação e agregação física das partículas, estabilização do pH, entre outras (ROSA, 2006), garantindo melhoria da fertilidade, proteção ambiental e reciclagem de nutrientes (MONDINI; SINICCO; CAYUELA, 2010).

Os efeitos do enriquecimento de solos estão relacionados à composição e qualidade dos materiais empregados (GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; CAYUELA; SINICCO; MONDINI, 2009; FUKA et al., 2009; HERNÁNDEZ; HOBBIÉ, 2010), podendo afetar principalmente a diversidade e composição das populações microbianas (ROS et al., 2006; TEJADA; HERNANDEZ; GARCIA, 2006; FUKA et al., 2009) bem como a produção, abundância e persistência de enzimas no solo (FERNANDES; BETTIOL; CERRI, 2005; GIANFREDA; RUGGIERO, 2006; IYYEMPERUMAL; SHI, 2008; SINEGANI; MAHOHI, 2010).

Diferentes mecanismos atuam na regulação da atividade enzimática em solo. Hernández e Hobbie (2010) propõem dois modelos possíveis para explicar, por exemplo, como a composição de um material pode afetar a atividade de enzimas extracelulares no solo. Um deles baseia-se na ideia de estimulação, ou seja, a adição de um dado material estimula somente a atividade das enzimas capazes de degradá-lo, tendo pouco ou nenhum efeito sobre outras. De acordo com os autores, essa estimulação pode se pronunciar inicialmente numa alteração da comunidade microbiana específica.

O outro modelo implica na relação entre a atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes, onde a carência de fontes de C e N assimiláveis leva a diminuição da atividade enzimática, enquanto o suprimento destas fontes ao solo implica em aumento da atividade de enzimas, de maneira inespecífica. Em qualquer dos modelos, a composição, quantidade e diversidade de substratos adicionados ao solo possui grande efeito sobre a comunidade microbiana e sua funcionalidade (HERNÁNDEZ; HOBBIÉ, 2010).

3.4 PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM SOLOS

3.4.1 Potencial Biotecnológico

Os principais instrumentos disponíveis para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos são os organismos e sua diversidade metabólica. As pesquisas e descobertas em biotecnologia iniciam-se com a utilização de material biológico apropriado, segue através da triagem de atributos desejáveis e seleção dos melhores candidatos identificados, e culmina com o desenvolvimento de um produto ou processo (BULL, WARD, GOODFELLOW, 2000). O conhecimento sobre a diversidade de organismos existentes no planeta Terra ainda é limitado, excetuando-se aquele relacionado aos grandes animais e plantas. Neste sentido, o conhecimento sobre a diversidade microbiana vem sendo dramaticamente modificado através dos estudos de diversidade molecular – DNA – em ecossistemas.

Micro-organismos são adaptados a diferentes condições climáticas, temperatura, salinidade, entre outros fatores, os quais influenciam em sua atividade e distribuição. Em função desta diversidade metabólica, da facilidade de seu cultivo em meios de baixo custo e da suscetibilidade para manipulação (genética ou ambiental), estes organismos podem ser explorados como fonte de enzimas e outros metabólitos de interesse industrial (SHARMA et al, 2001; STEELE et al., 2008; MAK; LEUNG; QIN, 2009). Dentre os vários micro-organismos, bactérias muitas vezes apresentam maior taxa de crescimento do que fungos, permitindo entre outras vantagens, uma maior produção de metabólitos (MAKI; LEUNG; QIN, 2009).

As manipulações ambientais ou genéticas têm grande influência no potencial biotecnológico de micro-organismos (HERNÁNDEZ; HOBBIE, 2010; KIELAK, 2013) tendendo ao aumento do rendimento das células, acarretando, por exemplo, em um aumento da produção enzimática. Ferramentas modernas da biologia molecular vêm alterando ainda mais o potencial biotecnológico da exploração da biodiversidade. A engenharia metabólica vêm trazendo novas possibilidades, linearizando vias e canalizando fluxos, buscando maior eficiência nos processos metabólicos, entretanto ainda em escala experimental (CHENG; LU, 2012).

3.4.2 Isolamento de Micro-organismos

Em ambientes naturais como o solo, os micro-organismos ocorrem quase sempre em uma população mista. Para avaliar as propriedades de um organismo definido fora de uma população mista, uma cultura pura é necessária. Técnicas de enriquecimento prévio do solo e meios de cultura têm sido usadas com sucesso para isolar e identificar micro-organismos com funções específicas. Essas técnicas têm a vantagem de estimular os micro-organismos com potencial de utilização do composto adicionado, como fonte de nutrientes, dando-lhes uma vantagem seletiva frente aos outros micro-organismos ali presentes (KUMAR; TAKAGI, 1999; MELO; AZEVEDO, 2008).

De acordo com Sinegani e Mahohi (2010) o enriquecimento orgânico em solo ocasiona aumento do número de bactérias cultiváveis. Para Nacke e colaboradores (2012), micro-organismos isolados de solo têm sido a maior fonte para obtenção de biomoléculas de importância industrial, como por exemplo, as enzimas.

3.5 ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

A utilização de catalisadores enzimáticos nos mais diferentes ramos industriais tem sido uma tendência cada vez maior, por características como segurança ambiental, eficiência, seletividade, entre outras. O mercado global de enzimas industriais está estimado em 3,3 bilhões de dólares anuais (2010), com expectativa de crescimento de 6,6 % ao ano, podendo alcançar 4,4 bilhões de dólares em 2015 (BINOD et al., 2013).

O mercado se encontra dividido em três grandes segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas indústrias de detergente, amido, têxtil, álcool combustível, polpa de papel e celulose e couro); alimentação e bebidas; e alimentação animal (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Atualmente cerca de 4000 enzimas são conhecidas mundialmente, e destas, aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana (SHARMA et al., 2001). Estas enzimas agrupam-se em diferentes classes, sendo que as hidrolases (75 % do mercado) e dentre estas as proteases, representam a maior fração do mercado global de enzimas.

No entanto, a tendência é de mudança neste quadro em função da crescente demanda por enzimas que possam ser utilizadas, por exemplo, em processos de biorremediação, tratamento de efluentes industriais, química fina e na hidrólise de biomassa vegetal para produção de bicomcombustíveis (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; HAKI; RAKSHIT, 2003; CORREIA, 2010; RAY, 2012).

3.5.1 Proteases

As proteases (E.C.3.4.) catalisam a hidrólise de proteínas através da clivagem de ligações peptídicas, por isso também designadas como peptidases. As peptidases extracelulares são responsáveis pela absorção dos produtos de hidrólise pelas células enquanto as intracelulares possuem papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Considerando que as proteases são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos, elas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e micro-organismos. As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das condições climáticas favoráveis. Já as proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo economicamente inviável. Desta forma, as proteases provenientes de micro-organismos são preferidas (RAO et al., 1998; CHERRY; FIDANTSEF, 2003; RAY, 2012).

Proteases (peptidases) de origem microbiana podem ser classificadas quanto a natureza do sítio ativo: serina protease (EC. 3.4.21), cisteína protease (EC 3.4.22), aspartil proteases (EC 3.4.23) ou metaloprotease (EC 3.4.24) (NASCIMENTO; MARTINS, 2004); quanto ao modo de atuação: exo e endopeptidases (HAKI; RAKSHIT, 2003); ou ainda quanto a característica catalítica, em: ácidas, neutras, alcalinas, e termoestáveis (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.5.1.1 Proteases bacterianas

Entre as proteases microbianas, as de origem bacteriana certamente são as de maior relevância, e neste grupo, representantes do gênero *Bacillus* spp. são os maiores produtores das proteases extracelulares utilizadas comercialmente (NASCIMENTO; MARTINS, 2004; UYAR; BAYSAL, 2004 ; JOO; CHANG, 2005). Beg e Gupta (2003) destacam 4 espécies: *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefacies*, *B. thermoproteolyticus* e *B. licheniformis*.

De acordo com Koka e Weimer (2000) proteases podem ser também produzidas por espécies de *Pseudomonas*, os autores citam a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, cujas proteases são resistentes ao tratamento de pasteurização do leite.

Dentro dos actinomicetos, cita-se a espécie *Streptomyces*, capaz de degradar macromoléculas em solos, sendo eficiente na quebra de proteínas. É o que destaca De Azeredo e colaboradores (2004) em estudo de uma protease termofílica proveniente de um representante deste gênero, isolado do solo do cerrado brasileiro. Fuka e colaboradores (2009) também sugerem as bactérias como a principal fonte de proteases extracelulares no solo, particularmente metaloproteases neutras e as serina-proteases.

Particularmente, as bactérias termofílicas produtoras de proteases são de grande interesse e têm se tornado cada vez mais úteis para aplicações comerciais. (HAKI; RAKSHIT, 2003; RAY, 2012). Até o momento, poucas bactérias termofílicas produtoras de protease foram isoladas, sendo que a primeira reportada foi *Bacillus stearothermophilus*, apresentando-se estável à 60 °C. Entre potenciais gêneros termófilos produtores desta enzima destaca-se *Pyrococcus* (*Pyrococcus* sp. KODI / 100 °C), *Thermococcus* (*Thermococcus litoralis* / 85°C; *Thermococcus aggregans* / 90°C; *Thermococcus celer* / 95 °C) (HAKI; RAKSHIT, 2003).

3.5.1.2 Aplicações

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (UYAR; BAYSAL, 2004; RAY, 2012) representando 60 % do mercado de enzimas, dos quais 40 % correspondem às proteases de origem microbiana.

As proteases bacterianas apresentam inúmeras aplicações, principalmente as provenientes de *Bacillus*, que possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas. Estas fazem parte de 20% do mercado de enzimas, com predominante aplicação em detergentes (GUPTA; BEG, 2002; JOO; CHANG, 2005).

Outras importantes aplicações de proteases incluem: indústria de alimentos; indústria farmacêutica; produção de couro; degomagem da seda; recuperação, solubilização bem como elucidação estrutural de proteínas; e gestão de resíduos industriais e domésticos (RAO et al.,1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; UYAR; BAYSAL, 2004; RAY, 2012).

3.5.1.2.1 Indústria de detergentes

A primeira protease bacteriana comercializada entrou no mercado em 1959, obtida a partir do cultivo de *Bacillus* sp. pela Novozymes, na Dinamarca, e a utilização destas enzimas como aditivo em detergentes teve início na década de 1960. A partir daí, seu desenvolvimento e expansão comercial foram estimulados (UYAR; BAYSAL, 2004; RAY, 2012).

Proteases são um dos ingredientes padrão de todos os tipos de detergentes, que vão desde aqueles usados em lavanderia, indústrias, hospitais até aqueles utilizados na limpeza de lentes de contato e próteses. Essa aplicação deve-se principalmente, à especificidade dessas enzimas em relação a alguns substratos constituintes do material a ser removido (RAO et al., 1998; CHERRY, FIDANTSEF, 2003).

Para este fim, a enzima deve resistir à presença de compostos iônicos e não iônicos, surfactantes, clarificantes e agentes quelantes (RAO et al.,1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; RAY, 2012). As enzimas usadas como aditivos em detergentes são predominantemente alcalinas e termoestáveis, uma vez que o pH dos detergentes varia de 9,0 a 12,0 e a temperatura de lavagem de 50 °C a 70 °C (BEG; GUPTA, 2003). A estabilidade das proteases utilizadas na indústria de detergentes é aumentada utilizando técnicas de engenharia genética (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.5.1.2.2 *Indústria de alimentos*

No setor de alimentação, as proteases são o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais como o aspartame, entre outras (RAO et al., 1998; RAY, 2012).

Na indústria de laticínios, é empregada na fabricação de queijo, onde contribui para o desenvolvimento do sabor, aroma e textura. Na panificação e na produção industrial de biscoitos, são utilizadas para hidrolisar o glúten e no caso de biscoitos tornam a massa adequada às etapas de laminação, formação e cozimento, podendo ser usadas para substituir o bissulfito de sódio, produto químico comumente utilizado no processo (RAO et al., 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.5.1.2.3 *Protease como agente de modificação de proteínas*

A aplicação de hidrólise enzimática às proteínas tem sido uma das principais áreas de pesquisa. As proteínas podem ter a sua funcionalidade tanto incrementada quanto diminuída, dependendo do grau de hidrólise aplicado. O uso das enzimas proteolíticas permite a produção de hidrolisados protéicos com diferentes estruturas moleculares, contribuindo para o desenvolvimento de características específicas, funcionais ou nutritivas (RAO et al., 1998; FURTADO et al., 2001; RAY, 2012). Hidrolisados de proteínas podem ser incorporados, por exemplo, em produtos dietéticos, suplementos e agentes flavorizantes.

As proteases bacterianas possuem importante aplicação na hidrólise de proteínas de soja, tornando-as solúveis para a utilização em bebidas, agregando valor nutritivo a estas. (RAO et al., 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Outros hidrolisados de proteínas comerciais são derivados da caseína e do soro de leite (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). A utilização de protease para a produção de um hidrolisado de resíduo de atum foi estudada com o objetivo de solubilizá-lo para a utilização como fonte protéica em rações animais (GUERARD; GUIMAS; BINET, 2002).

3.5.1.2.4 Indústria farmacêutica

A diversidade e especificidade de proteases são aproveitadas para o desenvolvimento de produtos de uso medicinal, agentes terapêuticos e auxiliares digestivos. Neste caso é requerido um alto grau de pureza das proteases (RAO et al., 1998). É citada a utilização dessas enzimas, por exemplo, no tratamento de queimaduras, feridas, carbúnculos, furúnculos, abscessos profundos e ulcerações da pele (RAY, 2012).

3.5.1.2.5 Indústria de couros

As proteases encontram aplicação nas várias fases do processamento de couros. Na fase inicial de limpeza, se fazem necessárias para remoção de pêlos enquanto nas fases finais são utilizadas na degradação parcial da queratina e elastina (LIM et al., 2001; RAY, 2012). Macedo e colaboradores (2005) descreveram uma nova protease de *Bacillus subtilis* capaz de promover a depilação de peles bovinas sem causar dano ao colágeno. Tecnicamente e ecologicamente, a depilação enzimática tem sido considerada a melhor alternativa para o processo.

A seleção de enzimas com especificidade para os substratos como elastina e queratina pode diminuir a quantidade de enzima utilizada no processo de depilação, reduzir a formação de resíduos, bem como o consumo de energia (RAO et al., 1998; RAY, 2012). Gupta, Beg e Lorenz (2002) citam a utilização das proteases alcalinas das bactérias *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* neste processo.

3.5.1.2.6 Recuperação da prata

Os resíduos de prata gerados nos processos fotoquímicos em hospitais, clínicas de radiologia, laboratórios fotográficos, indústrias e gráficas devem ser recuperados antes da disposição dos efluentes. Esses resíduos (na forma de filmes) contêm 1,5-2,0 % de prata agrupados em camada gelatinosa

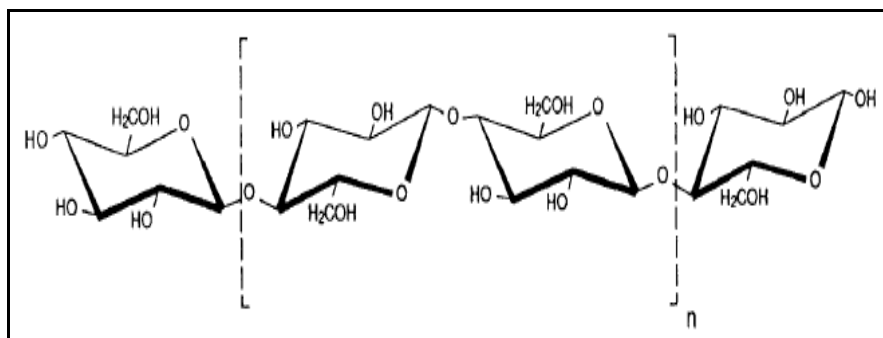
(material protéico), que podem e devem ser recuperados. Convencionalmente, esta recuperação é realizada pela queima destes resíduos, o que provoca poluição ambiental. Uma vez que a prata é ligada a gelatina, é possível extrair a prata a partir da degradação da camada proteica com a utilização de proteases (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.5.2 Celulases

A celulose é o principal produto da fotossíntese em ambientes terrestres e o recurso renovável mais abundantes na biosfera (100 bilhões de toneladas secas / ano) (PERCIVAL ZHANG et al., 2006) compreendendo (40-50 %) da madeira em árvores e em outros tecidos vegetais. O seu conteúdo varia entre 20% em algumas gramíneas para mais de 90 % na fibra de algodão (BAYER; LAMED, 1992). Nas plantas, a celulose está associada a outros biopolímeros, como hemiceluloses, pectinas e ligninas, o que remete à designação de materiais lignocelulósicos (DESVAUX, 2005).

Em termos estruturais, é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-glicose, que interagem entre si por ligações β -1,4 mantendo uma estrutura linear e plana, sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranosose, a unidade repetitiva do polímero (Figura 3). As cadeias se alinham de modo a formar fibrilas complexamente organizadas, as quais são estabilizadas entre si por ligações de hidrogênio intercadeias, que individualmente são fracas, mas coletivamente resultam em uma força significativa (BAYER; LAMED, 1992).

Figura 3 – Representação parcial da estrutura química da celulose



Fonte: Bayer e Lamed (1992)

A celulose apresenta alto grau de polimerização e elevado peso molecular, principalmente em sua forma cristalina, conferindo alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas. Desta forma a molécula é altamente estável apresentando um tempo de meia vida de 5–8 milhões de anos (PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

A estrutura da celulose pode ser clivada por intermédio de enzimas que reconheçam ligações β -1,4 entre moléculas de glicose, denominadas celulasas. Estas enzimas são fundamentais para a obtenção dos monossacarídeos componentes do biopolímero celulose, possibilitando sua utilização como fonte de carbono e a ciclagem do elemento carbono na biosfera (BAYER et al, 1998; PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a ocorrência de substâncias tóxicas como furfurais e derivados de lignina (BHAT, 2000; LYND et al., 2002).

Pertencentes a família das glicosil hidrolases, as celulasas hidrolizam oligossacarídeos e/ou polissacarídeos (BAYER et al. 1998), e são classificadas de acordo com suas diferentes formas de ação. São produzidas como um sistema multienzimático, compreendendo basicamente 3 enzimas que agem sinergicamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e β - Glicosidasas (EC 3.2.1.21) (PERCIVAL ZHANG et al., 2006; SHI, 2011).

3.5.2.1 Celulasas bacterianas

Entre bactérias, existe a presença de micro-organismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios (LYND et al., 2002), havendo uma diferença entre as estratégias de utilização do polímero pelos dois grupos. Micro-organismos anaeróbios não liberam as enzimas no meio extracelular e sim mantém um sistema enzimático complexo denominado Celulossomos, termo introduzido primeiramente a partir do estudo da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DESVAUX, 2005).

As bactérias que apresentam metabolismo aeróbio produzem grandes quantidades de enzimas extracelulares, podendo ser produzidas e recuperadas em curtos períodos de tempo. A maioria das bactérias celulolíticas do solo (*Bacillus*, *Micromonospora*, *Thermobifida*) também são produtoras de metabólitos secundários e endosporos, habilidades importantes que conferem vantagens seletivas na natureza (LYND et al., 2002).

Entre as bactérias aeróbias, os seguintes gêneros são descritos como produtores de celulases: *Cellulomonas*, várias espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* (SINGH; HAYASHI, 1995). Dentre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium* e *Ruminococcus* (LYND et al., 2002; DESVAUX, 2005).

Celulases termoestáveis incluem as provenientes de *Pyrococcus Horikoshi* e *Pyrococcus furiosus*, que apresentam temperaturas ótimas de catálise de 97°C e 102-105 °C, respectivamente (HAKI; RAKSHIT, 2003). Na ordem *Actinomycetales* (actinomicetos), destacam-se as espécies termofílicas *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces* e a mesofílica *Streptomyces*. Ambas correspondem à fração da comunidade microbiana responsável pela degradação lignocelulósica, sendo a ação de suas enzimas comparada às celulases fúngicas (SINGH; HAYASHI, 1995; LYND et al., 2002).

3.5.2.2 Aplicações

Celulases têm sido indispensáveis nas indústrias de alimentos, têxteis, de detergentes, e na indústria de papel. São empregadas em detergentes proporcionando brilho e maciez às roupas; na indústria têxtil é responsável pelo processo de bioestonagem do *jeans*, na indústria de alimentos, são utilizadas na extração de corantes e na melhoria da qualidade nutricional (HAKI; RAKSHITM, 2003; MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007). Atualmente essas enzimas têm despertado grande interesse na produção de bioetanol a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos (PERCIVAL ZHANG et al., 2006; MAKI; LEUG; QIN, 2009).

3.5.2.2.1 Hidrólise de materiais lignocelulósicos visando a produção de etanol

Com a escassez de combustíveis fósseis e a necessidade de fontes alternativas de energia renovável, há um interesse na bioconversão de biomassa lignocelulósica utilizando celulasas em conjunto com outras enzimas (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Percival Zhang e colaboradores (2006) destacam a procura mundial por processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala. De acordo com Mussato, Fernandes e Milagres (2007) o bioetanol é considerado mais potente que o álcool comum e até 20% menos poluente.

Entretanto, os custos para produção das enzimas aplicadas na produção de bioetanol deve ser reduzido e sua eficiência aumentada, a fim de tornar o processo viável em larga escala (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005). De acordo com Haki, Rakshit (2003) a utilização de celulasas na produção de bioetanol é responsável por até 40% do custo total. As pesquisas para a produção e desenvolvimento de celulasas mais eficientes, usando técnicas de engenharia genética, é um dos ramos que tem demonstrado avanços significativos (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

3.5.2.2.2 Indústria de alimentos

Em conjunto com pectinases, as celulasas são utilizadas em processos de maceração para extração de sucos de frutas e óleo de sementes (BHAT, 2000; KIRK, 2002) como óleo de oliva e também nos processos de filtração e clarificação. Dentre as celulasas destacam-se as β -glicosidases, que são aplicadas em processos de vinificação para a liberação de compostos aromáticos (terpenos, compostos fenólicos) com capacidade antioxidante e flavorizante (DAROIT et al., 2007) e as glucanases que são utilizadas no melhoramento do malte da cevada durante a produção da cerveja. São utilizadas também na extração de carotenóides para produção de corantes de alimentos (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

O uso de celulases no processamento de rações também é pronunciado, onde proporciona melhorias na digestibilidade e conseqüentemente no desempenho produtivo do animal . Segundo Bhat (2000) a indústria de alimentação animal movimenta um mercado superior a 50 bilhões de dólares em todo mundo.

3.5.2.2.3 Indústria de polpa de celulose e papel

São utilizadas no refino da polpa de celulose, removendo, por exemplo, os materiais lenhosos que dificultam o processo, aumentando assim a velocidade de fabricação do papel. Neste ramo destaca-se sua aplicação na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa para a formação das folhas de papel (PELACH et al., 2003). A enzima é empregada na fabricação de papel macio, incluindo guardanapos, toalhas e papel sanitário (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

3.5.2.2.4 Indústria têxtil e lavanderia

Na indústria têxtil, as celulases são aplicadas no processo de bioestonagem do *jeans*, substituindo as chamadas pedra-pomes que quando utilizadas danificam as fibras do tecido (MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007). Outros benefícios presentes com a adição de celulases são a redução do tempo de uso das máquinas envolvidas na estonagem, aumento da produtividade, melhorias nas condições de segurança no ambiente de trabalho e condições de automação do processo (BHAT, 2000; KIRK et al., 2002; CHEN et al., 2007).

Na lavagem de roupas em lavanderias, as celulases atuam na restauração da cor e brilho de roupas de algodão tecido, como também na remoção de microfibras desfiadas de algodão, formadas depois de repetidas lavagens (KIRK et al., 2002; SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005; CHEN et al., 2007).

De acordo com Haki, Rakshit (2003) este processo de biopolimento do algodão requer celulases em altas temperaturas.

3.5.3 Quitinases

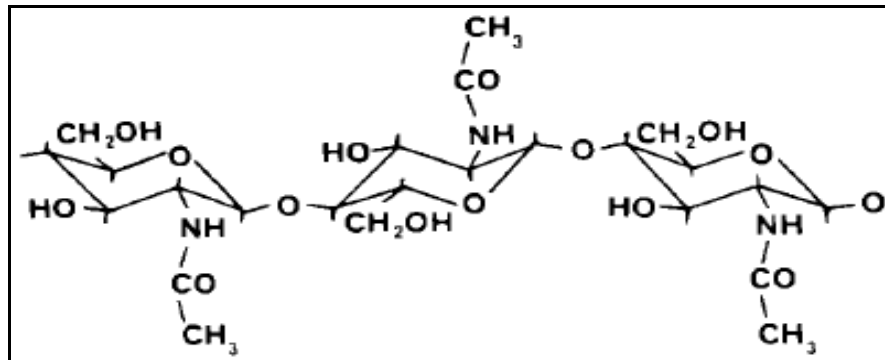
A quitina (Figura 4) é um homopolímero linear, insolúvel, formado por unidades de *N*-acetil-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. É um dos mais abundantes polissacarídeos na natureza (segundo biopolímero mais abundante, depois da celulose), comum no exoesqueleto de insetos, carapaça de crustáceos e parede celular de fungos e algas (FELSE; PANDA, 2000; PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; WANG et al., 2002; GUO; CHEN; LEE, 2004; SATO et al., 2010). A abundância e distribuição global da quitina a torna uma renovável fonte de carbono e nitrogênio (HUANG; CHEN; SU, 1996).

Todos os organismos que contêm quitina também contêm quitinases (CE 3.2.1.14), sendo necessárias para a morfogênese da parede celular e exoesqueleto (FELSE; PANDA, 2000; WANG et al, 2002). Essas enzimas são capazes de hidrolisar a quitina aos seus oligômeros e monômeros, através da clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas presentes no polímero (GUO; CHEN; LEE, 2004).

Todas as quitinases conhecidas pertencem a famílias de glicosil hidrolases (KIELAK et al., 2013) e são divididas em duas classes principais: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases hidrolisam aleatoriamente a cadeia linear interna da quitina, enquanto as exoquitinases atuam progressivamente nos terminais não redutores da quitina, catalisando a liberação sucessiva de diacetilquitobiose sem produzir monossacarídeos ou oligossacarídeos (FELSE; PANDA, 2000). A completa hidrólise de quitina para libertar *N*-acetilglicosamina é realizada por um sistema quitinolítico, cuja ação é conhecida por ser sinérgica e seqüencial (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

Alguns organismos que não contêm quitina em sua estrutura também produzem quitinases, neste caso por propósitos nutricionais e/ou defensivos, como, por exemplo, uma ampla variedade de bactérias e plantas (WANG et al, 2002). A atividade quitinolítica em soro humano também já foi descrita, sendo sugerida como mecanismo de defesa contra patógenos fúngicos (GUO; CHEN; LEE, 2004).

Figura 4 – Representação parcial da estrutura química da quitina



Fonte: Gooday (1990)

3.5.3.1 Quitinases Bacterianas

Bactérias estão entre os principais micro-organismos degradadores de quitina em ecossistemas naturais como o solo, podendo usá-la como fonte energética e nutritiva (KIELAK et al., 2013). Para estes micro-organismos, as quitinases desempenham também importante função nas relações de parasitismo (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

A maioria das quitinases bacterianas já identificadas está atribuída ao grupo A da família 18 das glicosil hidrolases, considerado o grupo mais abundante no ambiente. Além disso, esse grupo é caracterizado pelo bom funcionamento em pHs elevados, encontrando aplicações na agricultura e indústria. Entretanto, atualmente são poucos os exemplos de quitinases de origem bacteriana que estão comercialmente disponíveis. Estão disponíveis hoje as provenientes de *Bacillus*, *Serratia* e *Streptomyces* (KIELAK et al., 2013).

De acordo com Gooday (1990) bactérias quitinolíticas podem ser facilmente isoladas do solo, sendo que o número e tipos relatados variam com o tipo de solos e método de isolamento empregado. O pH e a umidade do solo parecem ter fortes efeitos sobre a comunidade microbiana quitinolítica, sendo que em solos neutros ou alcalinos de alta umidade, as bactérias são o grupo dominante na degradação da quitina (DE BOER; GERARDS; GUNNEWIEK, 1999).

Quitinases são produzidas por uma série de bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas não por Arqueobactérias (GOODAY, 1990). Entre as bactérias produtoras de quitinase já isoladas de solo citam-se os gêneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (GOODAY, 1990; FELSE; PANDA, 2000), *Cytophaga johnsonae*, *Lysobacter*, *Arthrobacter*, e entre os actinomicetos o gênero *Streptomyces* (GOODAY, 1990).

Guo, Chen, Lee (2004) destacam *Bacillus licheniformis*, *Nocardia orientalis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio alginolyticus* e diversas cepas de *Aeromonas*. Lorentz (2005) cita *Streptomyces*, *Bacillus* e *Vibrio* como os gêneros de maior atividade quitinolítica.

Haki e Rakshit (2003) destacam as bactérias termofílicas *Bacillus licheniformis* X-7u, *Bacillus* sp. BG-11 e *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 como potenciais fontes de quitinase. A produção de quitinase por bactérias tem demonstrado ser induzida por oligômeros de quitina e baixos níveis de *N*-acetilglicosamina (GOODAY, 1990).

3.5.3.2 Aplicações

A habilidade dessas enzimas em degradar materiais quitinosos, dentre eles a parede celular de fungos, propicia aplicações envolvidas com o controle de pragas, sendo incorporadas em biopesticidas e gerando conseqüente diminuição da poluição ambiental. Além disso, são utilizadas para obtenção de oligossacarídeos biologicamente ativos e no isolamento de protoplastos fúngicos. De forma geral, as quitinases podem ser utilizadas na obtenção de produtos de alto valor agregado a partir de resíduos quitinosos (FELSE; PANDA, 2000; PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; BAKSHI; VARMA, 2011).

3.5.3.2.1 Controle biológico

Esta aplicação é considerada a de maior relevância quando comparada a outras realizadas pela enzima. Quitinases têm aplicações no controle biológico de fungos e insetos patogênicos, sendo alvo na fabricação de biopesticidas. O controle biológico representa um meio alternativo e atrativo, evitando o impacto negativo de fungicidas químicos caracterizados pelo alto custo e alta toxicidade ao meio ambiente (HUANG; CHEN; SU, 1996; WANG et al., 2002; SATO et al., 2010; KIELAK et al., 2013).

Em estudo de duas quitinases produzidas pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* isolada do solo, foi observada atividade antifúngica das enzimas contra *Fusarium oxysporum* (WANG et al., 2002). A suplementação de solo com resíduos quitinosos e subsequente inoculação com micro-organismos quitinolíticos resultou em eficiente biocontrole de *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* em algodão e feijão (FELSE; PANDA, 2000).

3.5.3.2.2 Obtenção de quito-oligossacarídeos

Derivados da quitina, seja na forma de oligômero ou monômero, vêm recebendo atenção devido à sua ampla gama de aplicações. Oligômeros de quitina têm demonstrado atividades fisiológicas funcionais, incluindo a atividade anti-tumoral e de imuno-melhoramento (GUO; CHEN; LEE, 2004; PATIL et al., 2000).

Estes oligômeros, para serem biologicamente ativos, geralmente precisam ter um grau de polimerização relativamente alto. Como a produção de quito-oligômeros por hidrólise ácida leva a um baixo grau de polimerização, a hidrólise enzimática é uma alternativa, já que as diversas enzimas do complexo quitinolítico possibilitam produzir quito-oligômeros com diversos graus de polimerização (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999). Assim, é essencial a procura por quitinases eficientes e o desenvolvimento de processos para a hidrólise enzimática da quitina (GUO; CHEN; LEE, 2004).

3.5.3.2.3 Degradação de resíduos quitinosos

O monômero da quitina *N*-acetilglicosamina é comumente utilizado na produção de intermediários químicos-farmacêuticos, como também em produtos alimentícios, dentre eles adoçantes e fatores de crescimento. A *N*-acetilglicosamina é tradicionalmente preparada por hidrólise, envolvendo fortes ácidos ou ainda por síntese química a partir de glucosamina. Tais processos envolvem alto custo e problemas de corrosão. Grande atenção tem sido dada a produção desses monômeros a partir de hidrólise enzimática da quitina (FELSE; PANDA, 2000).

Enzimas quitinolíticas têm importante atuação no aproveitamento de resíduos de escamas de peixes e cascas de crustáceos, pois não só eliminam problemas ambientais, mas também diminuem o custo da produção de quitinas microbianas. Estes restos marinhos, contêm além da quitina, proteínas e compostos inorgânicos como o carbonato de cálcio, os quais podem também ser aproveitados (FELSE; PANDA, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

Para o preparo das principais soluções foram utilizados reagentes químicos de grau analítico (PA). Foram utilizados os seguintes reagentes específicos:

- Avicel (Sigma Aldrich)
- Carboximetilcelulose (Sigma Aldrich)
- Caseinato de Sódio (Sigma Aldrich)
- 4-(Dimetilamino)benzaldeído - DMBA (Sigma Aldrich)
- N-Acetilglicosamina (Sigma Aldrich)
- Quitina de Camarão (Sigma Aldrich)
- Tirosina (Sigma Aldrich)

4.1.2 Solos

4.1.2.1 Seleção e procedência

Para realização dos objetivos propostos, foram selecionados dois locais representativos de diferentes usos de solo: solo agrícola e solo sob pouso com cobertura de mata secundária, ambos coletados na área da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, sob coordenadas 23°20'31" S e 51°12'38" O.

4.1.2.2 Coleta e armazenamento

Foram coletados aproximadamente 20 kg de cada solo selecionado, em camada superficial (0-10 cm), contemplando três diferentes pontos dentro de uma área considerada visualmente uniforme. Conforme proposto por Melo e Azevedo (2008), após a coleta os mesmos foram peneirados, armazenados em sacos de polietileno e mantidos em câmara fria a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da utilização.

4.1.2.3 Caracterização química

A caracterização química dos solos foi realizada pelo Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL conforme metodologia descrita por Pavan e Miyazawa (1996). Determinou-se as seguintes propriedades: Acidez (pH), Teor de Matéria Orgânica (MO), Carbono (C), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Alumínio (Al).

4.1.3 Substratos Indutores (SI)

4.1.3.1 Seleção e procedência

Para aplicação da estratégia de enriquecimento seletivo foram selecionados 3 diferentes materiais orgânicos de acordo com os objetivos propostos, como mostra a Tabela 2. Esses materiais foram tratados ao longo do trabalho como Substratos Indutores (SI).

Tabela 2 – Seleção e procedência dos Substratos Indutores (SI) de acordo com os objetivos propostos

Substrato Indutor (SI)	Procedência	Objetivo ¹
Bagaço de Cana-de-Açúcar (BC)	Fazenda Escola UEL	Prospecção de bactérias Celulolíticas
Farelo de Soja (FS)	Comercial (Magnatus)	Prospecção de bactérias Proteolíticas
Farelo de Crisálida (FC)	Bratac - Fiação de Seda	Prospecção de bactérias Quitinolíticas

¹Incrementação quali-quantitativa de representantes da comunidade bacteriana com atividade hidrolítica compatível ao substrato indutor adicionado ao solo

4.1.3.2 Preparo e armazenamento

Os substratos indutores (APÊNDICE 1) foram utilizados como adquiridos, exceto a crisálida do bicho-da-seda que passou por processo de secagem (ao sol) e maceração, de forma a obter um farelo. Os substratos indutores foram armazenados em câmara fria a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento de utilização.

4.2 MÉTODOS

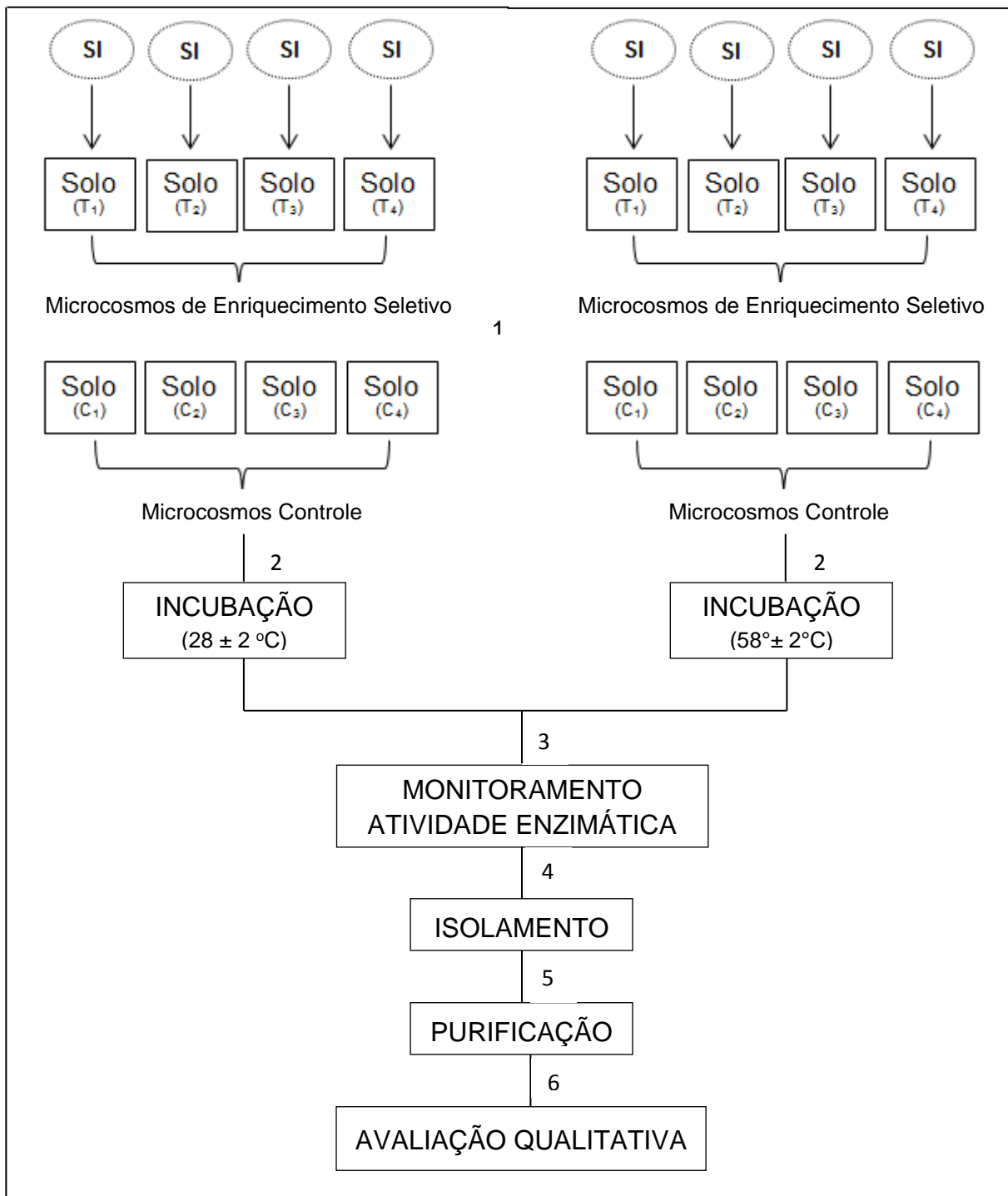
A estratégia de enriquecimento seletivo aplicada para a prospecção de bactérias produtoras de hidrolases em solo, utilizada no presente estudo, baseou-se em 6 etapas principais, as quais estão apresentadas na Figura 5.

4.2.1 Adição de Substratos Indutores a Amostras de Solo Agrícola e Solo sob Pousio – Montagem de Microcosmos

Com a finalidade de promover o enriquecimento seletivo da comunidade microbiana nativa dos solo com bactérias especializadas na hidrólise enzimática dos substratos indutores (SI) selecionados, foram montados diferentes microcosmos como descrito a seguir: Os SI foram adicionados na concentração de 5 % (m/m), a partir da mistura de 10,0 g de cada SI selecionado com 190,0 g de cada tipo de solo, as quais após homogeneização, foram acondicionadas em recipientes plásticos e incubadas em estufa com circulação forçada de ar sob temperatura diferenciada, visando especificamente o isolamento de bactérias mesofílicas (incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$), e termofílicas (incubação a $58 \pm 2^\circ\text{C}$), conforme apresentado na Tabela 3.

A fim de se obter parâmetros comparativos de controle, foram também preparados microcosmos na ausência de SI (200,0 g de Solo), os quais foram mantidos simultaneamente aos microcosmos de enriquecimento seletivos, sob as mesmas condições anteriormente descritas. A umidade de todos os microcosmos foi mantida (desconsiderando a umidade inicial dos solos) a 20% (v/m), a partir da adição regular de água destilada, durante todo o período de incubação (padronizado em 35 dias). Cada um dos microcosmos foi montado em quadruplicata, inclusive os controles.

Figura 5- Fluxograma representativo da metodologia aplicada para a prospecção de bactérias produtoras de hidrolases em solo¹



¹ 6 Etapas Principais: 1- Montagem de microcosmos de enriquecimento seletivo (na presença de SI) e dos respectivos microcosmos controle (na ausência de SI), em quadruplicata para cada condição; 2- Incubação dos microcosmos sob duas diferentes temperaturas visando a obtenção de bactérias mesofílicas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e termofílicas ($58 \pm 2^\circ\text{C}$); 3 - Monitoramento da atividade hidrolítica específica correspondente ao SI adicionado (atividade celulolítica, proteolítica ou quitinolítica); 4- Isolamento de bactérias em população elevada e ativas na hidrólise dos SI adicionados; 5- Obtenção de isolados puros e formação da coleção; 6- Avaliação qualitativa dos isolados bacterianos obtidos quanto à produção das enzimas de interesse (Celulase, Protease, Quitinase)

Tabela 3 – Descrição dos microcosmos montados para avaliar o efeito da adição de diferentes substratos indutores e da temperatura de incubação sobre a composição quali-quantitativa da comunidade microbiana nativa de solo agrícola e solo sob Pousio

Solo	Temperatura Incubação ¹	Classe Enzimática ²	Substrato Indutor (SI) ³		
			BC	FS	FC
Agrícola	28°C	Controle ⁴	C ⁵	C ⁵	C ⁵
	58°C	Controle ⁴	C ⁵	C ⁵	C ⁵
Pousio	28°C	Controle ⁴	C ⁵	C ⁵	C ⁵
	58°C	Controle ⁴	C ⁵	C ⁵	C ⁵
Agrícola	28°C	Celulolíticos	10,0 g ⁶	N/A	N/A
	58°C	Celulolíticos	10,0 g ⁶	N/A	N/A
Agrícola	28°C	Proteolíticos	N/A	10,0 g ⁶	N/A
	58°C	Proteolíticos	N/A	10,0 g ⁶	N/A
Agrícola	28°C	Quitinolíticos	N/A	N/A	10,0 g ⁶
	58°C	Quitinolíticos	N/A	N/A	10,0 g ⁶
Pousio	28°C	Celulolíticos	10,0 g ⁶	N/A	N/A
	58°C	Celulolíticos	10,0 g ⁶	N/A	N/A
Pousio	28°C	Proteolíticos	N/A	10,0 g ⁶	N/A
	58°C	Proteolíticos	N/A	10,0 g ⁶	N/A
Pousio	28°C	Quitinolíticos	N/A	N/A	10,0 g ⁶
	58°C	Quitinolíticos	N/A	N/A	10,0 g ⁶

¹ Correspondente à temperatura de crescimento selecionada para o isolamento de bactérias mesofílicas (28°C) e termofílicas (58°C). ² Correspondente ao grupo bacteriano de interesse. ³ Conforme Tabela 2: BC – bagaço de cana-de-açúcar; FS – farelo de soja; FC – farelo de crisálida. ⁴ Enriquecimento Não Esperado. ⁵ Microcosmos preparados na ausência de Substrato Indutor (microcosmos controle contendo 200,0 g de solo). ⁶ Quantidade de Substrato Indutor adicionada em 190,0g de solo (microcosmos de enriquecido seletivo). N/A- Não Aplicável

4.2.2 Monitoramento da Atividade Enzimática em Amostras de Solo Agrícola e Solo sob Pousio na Presença e Ausência de Substrato Indutor (SI)

Com a finalidade de identificar o tempo ideal de incubação dos microcosmos para a realização do isolamento das bactérias ativas na hidrólise dos substratos indutores adicionados, foi realizado o monitoramento da atividade hidrolítica específica correspondente ao substrato indutor adicionado. Para cada microcosmo de enriquecimento seletivo e seu respectivo microcosmo controle, sob as diferentes temperaturas de incubação, a determinação da atividade enzimática foi realizada a cada 3-4 dias de incubação, durante todo o período experimental (35 dias). Foram coletadas porções de solo dos microcosmos nos tempos: 0 (uma hora após a montagem dos microcosmos), e após 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31 e 35 dias de incubação.

4.2.2.1 Monitoramento da atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi monitorada nos microcosmos que receberam bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato indutor, e nos respectivos microcosmos controles. Foi utilizado o método de Hope e Burns (1987) detalhado por Alef e Nannipieri (1995a), com algumas modificações. O método baseia-se na determinação quantitativa dos açúcares redutores presentes em solução, liberados após a incubação de amostras de solo com o substrato Avicel por 16 h a 40°C.

A cada coleta, 1,0 grama de solo dos microcosmos monitorados foram adicionados a Erlenmeyers (50 mL), misturados com 8 mL de Tampão Acetato (ANEXO C) mais 0,5 g de Avicel (Sigma Aldrich) e levados a agitação (100 rpm) em shaker a 40 °C por 16 horas. Os controles (brancos) dos ensaios enzimáticos foram preparados a partir da adição de Avicel apenas após o período de incubação. Ao final do período de incubação, foi feita a determinação quantitativa dos açúcares redutores pelo método de Somogy-Nelson (ALEF; NANNIPIERI, 1995a). Para este fim, as suspensões de solo resultantes foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm para precipitação dos colóides do solo, coletando-se a fase aquosa (sobrenadante).

Para determinação dos açúcares redutores, transferiu-se alíquotas de 1 mL da fase aquosa (sobrenadante) para tubos de ensaio, juntamente com 1 mL de solução de Somogy. Os tubos foram levados a banho Maria por 20 minutos a 100°C, e receberam 1 mL de solução de Nelson após alcançarem a temperatura ambiente. Para a leitura espectrofotométrica, as amostras foram adicionadas de 3 mL de água destilada.

As respectivas absorvâncias foram determinadas em comprimento de onda de 520 nm, sendo correlacionadas a uma curva de calibração construída a partir de uma solução de glicose (79 µg mL⁻¹). Os valores de atividade celulolítica foram expressos em quantidade de glicose liberada por grama de solo por tempo de incubação (µg glicose g⁻¹ 16h⁻¹).

Glicose liberada (µg glicose g⁻¹ 16h⁻¹):

$$AE = \frac{c \cdot v \cdot d}{p_{\text{Seco}}}$$

Onde,

AE = Atividade Enzimática

c = Concentração de Glicose obtida a partir de Curva de Calibração

v = Volume da Suspensão de Solo

p_{Seco} = Peso seco relativo a 1,0 g de solo umido

d = Fator diluição

4.2.2.2 Monitoramento da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi monitorada nos microcosmos que receberam farelo de soja (FS) como substrato indutor, e nos respectivos microcosmos controles. Foi determinada pelo método de Ladd e Butler (1972) detalhado por Alef e Nannipieri (1995b), com algumas modificações. O método consiste na incubação de amostras de solo com solução de caseína por 2 h a 50 °C, seguindo-se a determinação da quantidade de tirosina liberada por meio da reação com o reagente Folin-Ciocateau.

A cada coleta, 1,0 grama de solo dos microcosmos monitorados foram adicionados a Erlenmeyers (50 mL), misturados com 5 mL de Tampão Tris (ANEXO C), 5 mL de Solução de Caseinato de sódio (Sigma Aldrich) a 2% (ANEXO C) e levados a agitação em shaker (100 rpm) por 2 horas a 40 °C.

Ao final da incubação, foram adicionados 5 mL de Solução de TCA (ANEXO C) com agitação manual vigorosa. Os controles (brancos) dos ensaios enzimáticos foram preparados a partir da adição da Solução de Caseinato de Sódio apenas após o período de incubação e imediatamente antes da adição da Solução de TCA.

As suspensões de solo resultantes foram então centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm para a precipitação dos colóides do solo, sendo transferidas alíquotas de 1 mL de cada fase aquosa (sobrenadante) para tubo de ensaio juntamente com 1,5 mL de Reagente Alcalino (ANEXO C). Adicionou-se então 1mL de Reagente Fenol de Folin-Ciocalteu (ANEXO C), e após o desenvolvimento de coloração azul, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 700 nm e correlacionadas a curva de calibração construída a partir de uma solução de tirosina (500 µg mL⁻¹).

A atividade proteolítica foi expressa em quantidade de tirosina liberada por grama de solo por tempo de incubação (µg Tirosina g⁻¹ 2h⁻¹).

Atividade de Protease (µg Tirosina g⁻¹ 2h⁻¹):

$$AE = \frac{c \cdot v \cdot d}{p_{\text{Seco}}}$$

Onde,

AE = Atividade Enzimática

c = Concentração de Tirosina obtida a partir de Curva de Calibração,

v = Volume da Suspensão de Solo

p_{Seco} = Peso seco relativo a 1,0 g de solo umido

d = Fator diluição

4.2.2.3 Monitoramento da atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica foi monitorada nos microcosmos que receberam farelo de crisálida (FC) como substrato indutor, e nos respectivos microcosmos controles. Foi utilizado o método de Rodriguez-Kabana et al. (1983) detalhado por Alef e Nannipieri (1995c), com algumas modificações. O método consiste na incubação da amostra de solo com solução de quitina coloidal por 16 horas a 37 °C, seguindo-se a determinação da quantidade de *N*-acetilglicosamina liberada.

A cada coleta, 1,0 grama de solo dos microcosmos monitorados foram adicionados a Erlenmeyers (50 mL), juntamente com 5 mL de Tampão Fosfato (ANEXO C) e 5 mL de Solução de Quitina Coloidal (ANEXO C) sendo levados a agitação em shaker (100 rpm) a 37 °C por período de 16 horas. Os controles (brancos) dos ensaios enzimáticos foram preparados a partir da adição de quitina coloidal apenas após o período de incubação.

Ao final da incubação, foram adicionados 10 mL de Solução Extratora (ANEXO C) com agitação manual vigorosa dos frascos. As suspensões resultantes foram então centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm para a precipitação dos colóides do solo. Posteriormente, 0,5 mL da fase aquosa (sobrenadante) foi misturado a 1,5 mL de água destilada, 0,4 mL de Tampão Borato (ANEXO C) e levado a banho Maria a 100 °C por 3 minutos. Após alcançarem a temperatura ambiente, adicionou-se 5 mL de solução DMBA (ANEXO C) e após intensa agitação os tubos foram incubados em banho maria a 35 °C.

Após ambientação, as respectivas absorbâncias foram medidas em comprimento de onda de 585 nm, sendo correlacionadas a curva de calibração construída a partir de uma solução de *N*-acetilglicosamina (10 mg mL⁻¹). Os valores de atividade da quitinase foram expressos em quantidade de *N*-acetilglicosamina liberada por grama de solo por tempo de incubação (µg *N*-acetilglicosamina g⁻¹16h⁻¹).

Atividade de Quitinase (µg *N*-acetilglicosamina g⁻¹16h⁻¹):

$$AE = \frac{c \cdot v \cdot d}{\rho_{\text{Seco}}}$$

Onde,

AE = Atividade Enzimática

c = Concentração de *N*-acetilglucosamina obtida a partir de Curva de Calibração

v = Volume da Suspensão de Solo

p_{Seco} = Peso seco relativo a 1,0 g de solo umido

d = Fator diluição

4.2.3 Isolamento de Bactérias em Amostras de Solo Agrícola e Solo sob Pousio na Presença e Ausência de Substrato Indutor (SI)

O isolamento de bactérias foi realizado nos mesmos períodos selecionados para o monitoramento da atividade enzimática, mas não necessariamente em todos, uma vez que, determinado o tempo ideal de incubação na etapa de monitoramento enzimático, não se fez necessário o isolamento nos períodos subsequentes. Amostras dos microcosmos de enriquecimento seletivo coletadas nos tempos 0 (uma hora após a montagem dos microcosmos), e após no máximo 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31 ou 35 dias de incubação, foram utilizadas para o isolamento. Para fins comparativos, aplicou-se também o isolamento de bactérias nos microcosmos controle nos mesmos períodos selecionados para os microcosmos de enriquecimento seletivo.

Em cada momento de coleta, foram transferidos 1 g de solo de cada microcosmo para tubos de ensaio, adicionados de 9 mL de solução salina esterilizada, agitando-se em vórtex por aproximadamente 30 segundos para a desorção das células associadas aos colóides do solo (MELO, AZEVEDO, 2008). Estas suspensões foram seriadamente diluídas em solução salina esterilizada (1:10, v/v).

Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-4} – 10^{-8} foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo diferentes meios de cultivo sólidos (meio Dyg's e Meio Mínimo; ANEXO A), seguindo-se a incubação das placas em estufa a 28 ± 2 °C por 5 dias.

As menores diluições (10^{-1} – 10^{-3}) não foram utilizadas para o isolamento de bactérias a fim de se evitar que representantes oportunistas da comunidade microbiana não fossem acessados, sendo a coleção assim formada somente por bactérias que apresentassem elevada capacidade de utilização dos substratos indutores.

Todas as placas resultantes dos isolamentos foram inicialmente armazenadas em câmara fria a 4°C, entretanto, para a formação da coleção de isolados bacterianos de potencial interesse biotecnológico, somente as placas provenientes dos isolamentos relativos ao tempo ideal de incubação foram utilizadas, passando por posterior processo de purificação, armazenamento e contabilização dos isolados.

Os diferentes morfotipos, obtidos na etapa de isolamento referente ao tempo ideal de incubação (máxima atividade enzimática no solo), foram purificados em Meio Dyg's Sólido pela técnica de esgotamento. As colônias de isolados considerados puros foram repicadas para meio de cultivo Dygs líquido e cultivadas por 24 h sob agitação de 180 rpm a 28 ± 2 °C, sendo em seguida adicionadas de glicerol em proporção 1:1 (v/v), e armazenadas a -20 °C.

Nos microcosmos de enriquecimento seletivo de solo sob Pousio na presença do SI farelo de crisálida (FC), sob as duas temperaturas propostas (28 °C e 58 °C), o parâmetro monitoramento enzimático não permitiu a determinação de um tempo de incubação ideal ao isolamento de bactérias. Nestes casos, procedeu-se o isolamento após o período limite de incubação (35 dias). O mesmo foi aplicado aos respectivos microcosmos controle.

Assim como a etapa de monitoramento enzimático, a etapa de isolamento também foi realizada em quadruplicata para cada microcosmo, a fim de se avaliar a reprodutividade de possíveis efeitos dos SI na microbiota dos solos.

4.2.4 Avaliação Qualitativa da Produção de Hidrolases pelos Isolados Bacterianos: Identificação de Bactérias com Potencial de Aplicação Biotecnológica

Todos os isolados bacterianos obtidos no tempo ideal de incubação foram avaliados qualitativamente quanto à capacidade de produção das enzimas líticas de interesse, conforme tratamento de enriquecimento seletivo de origem, como apresentado na Tabela 4.

Em todas as análises, foram preparadas placas de Petri contendo meios de cultivo sólidos adicionados de um reagente específico para a identificação de cada uma das enzimas.

Após a solidificação em placas de Petri, os meios de cultivo foram triplamente e equidistantemente perfurados com auxílio de perfurador (diâmetro de 0,7 cm) de forma a obter orifícios, os quais foram inoculados com alíquotas de 100µL de pré-inóculo dos isolados. Desta forma, os resultados das avaliações qualitativas puderam ser obtidos em triplicata para cada isolado em uma mesma placa de Petri. Os pré-inóculos foram preparados a partir do cultivo de cada um dos isolados (estoque) em meio Dygs líquido, mantido em agitação orbital (180 rpm) a 28 °C por 16 horas.

Tabela 4 – Descrição das avaliações qualitativas aplicadas aos isolados bacterianos conforme microcosmo de enriquecimento seletivo de origem

Origem Isolados	Avaliação	Reagente Específico	Referência
Microcosmos contendo BC ¹	Produção de Celulase	Carboximetilcelulose	SALLES et al., 2010
Microcosmos contendo FS ¹	Produção de Protease	Leite Desnatado	DUARTE et al., 2009
Microcosmos contendo FC ¹	Produção de Quitinase	Quitina Coloidal	WANG et al., 2002

¹E respectivos microcosmos controle

4.2.4.1 Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de celulase

Para identificação da capacidade celulolítica, os isolados obtidos a partir dos microcosmos de enriquecimento seletivo contendo o SI BC (candidatos a produção de celulase) e os isolados obtidos a partir dos respectivos microcosmos controles, foram inoculados ao meio sólido proposto por Salles e colaboradores (2010), contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (ANEXO B). Após 24 horas de incubação a 38 °C, as placas foram coradas com 20 mL de solução vermelho congo a 0,1 %, sendo mantidas em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lavadas com solução descorante (NaCl 0,5M).

A presença de halos claros ao redor dos pontos de inoculação das bactérias identifica a existência de atividade celulolítica pelos isolados. Para aqueles que apresentaram atividade enzimática, foi estimado o IE (Índice Enzimático) conforme proposto por Hankin e Anagnostakis (1975) com algumas modificações, a partir da razão entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro do orifício inoculado (0,7 cm). Cada isolado teve seu IE determinado em triplicata, e estes valores foram utilizados para identificar os isolados bacterianos de maior potencial quanto à produção desta enzima.

4.2.4.2 Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de protease

Para identificação da capacidade proteolítica os isolados obtidos a partir dos microcosmos de enriquecimento seletivo contendo o SI FS (candidatos a produção de protease) e os isolados obtidos a partir dos respectivos microcosmos controles, foram inoculados ao meio sólido proposto por Duarte e colaboradores (2009), contendo leite em pó desnatado como única fonte de carbono (ANEXO B). Os autores citados acima propõem 14 dias de incubação a 30°C, entretanto no presente trabalho padronizou-se o período de 3 dias, sendo suficiente para efetiva visualização dos resultados. A presença de halos claros ao redor dos pontos de inoculação das bactérias identifica a existência de atividade proteolítica pelos isolados.

O Índice Enzimático (IE) foi determinado conforme já descrito, e estes valores foram utilizados para identificar os isolados bacterianos de maior potencial biotecnológico quanto à produção desta enzima.

4.2.4.3 Cultivo em meio sólido para avaliação qualitativa da produção de quitinase

Para identificação da capacidade quitinolítica os isolados obtidos a partir dos microcosmos de enriquecimento seletivo contendo o SI FC (candidatos a produção de quitinase) e os isolados obtidos a partir dos respectivos microcosmos controles, foram inoculados ao meio sólido proposto por Wang (2002) contendo quitina coloidal como única fonte de carbono (ANEXO B). A incubação foi realizada a 37 °C por período de 5 dias. A presença de halos claros ao redor do ponto de inoculação das bactérias identifica a existência de atividade quitinolítica pelos isolados. O Índice Enzimático (IE) foi determinado conforme já descrito, e estes valores foram utilizados para identificar os isolados bacterianos de maior potencial biotecnológico quanto à produção desta enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS

Os resultados da análise química dos solos agrícola e sob pousio estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Características químicas dos solos experimentais

Solo ¹	pH	K	Ca	Mg	Al	P	C	MO
	(CaCl ₂)	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————
			cmol _c dm ⁻³				g Kg ⁻¹	
Agrícola	5,2	0,93	7,0	1,1	0,1	19,9	2,18	3,8
Sob Pousio	5,0	0,65	5,7	3,0	0,06	3,3	1,79	3,0

¹ Profundidade = 0-10 cm

De acordo com os critérios estabelecidos por Freire e colaboradores (2006), é possível verificar uma grande diferença entre os parâmetros químicos dos dois solos utilizados, mesmo considerando que ambos localizam-se fisicamente próximos e possuem atributos em comum, evidenciando, portanto, o efeito do tipo de uso sobre estas propriedades. As diferenças observadas provavelmente refletem a utilização de fertilizantes minerais sobre a área de cultivo agrícola, prática que não é comum em áreas sob Pousio. Nota-se que o solo agrícola apresenta melhores características de fertilidade, identificada pelos maiores teores em praticamente todos os parâmetros avaliados.

Dentro dos atributos químicos do solo que influenciam a diversidade e atividade microbiana, o pH apresenta a maior importância. Em geral, um solo com pH próximo ao neutro fornece um ambiente mais adequado para a disponibilidade de nutrientes e crescimento microbiano (NAHER et al., 2009). Além disso, a comunidade microbiana também é afetada pelo sistema de manejo. A forma como os resíduos das culturas anteriores são depositados e o grau de revolvimento do solo influenciam na velocidade de mineralização da matéria orgânica, e consequentemente na disponibilidade de nutrientes (VARGAS; SCHOLLES, 2000).

Com base dos resultados da análise química, independentemente do tipo de substrato indutor adicionado ao solo, pode-se sugerir que a maior disponibilidade de nutrientes no solo agrícola em comparação ao solo sob Pousio, apresenta maior capacidade de suporte a elevadas populações microbianas.

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA CELULOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSIO

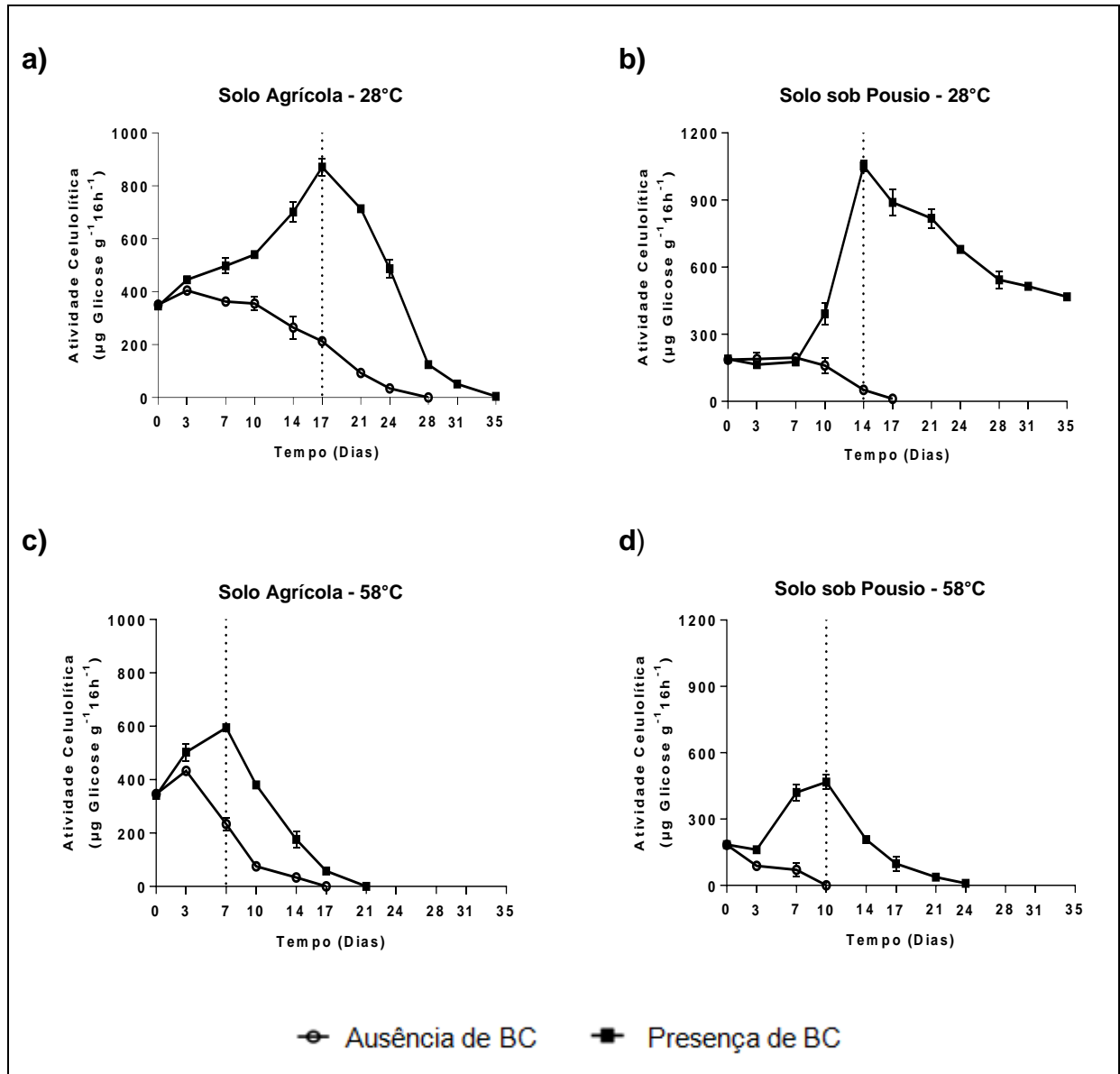
5.2.1 Monitoramento da Atividade Celulolítica

A atividade celulolítica foi monitorada nos microcosmos de solo agrícola e solo sob pousio quando na ausência e presença do SI BC sob duas diferentes temperaturas de incubação, visando identificar os efeitos de tal resíduo na estimulação/prospecção das comunidades microbianas celulolíticas presentes, estando os resultados apresentados na Figura 6.

Uma análise comparativa geral da atividade celulolítica dos solos na condição inicial (ausência de SI BC, em $t=0$), ainda sem o efeito da temperatura de incubação, possibilita observar que o solo sob uso agrícola apresentou maior atividade celulolítica comparativamente ao solo sob pousio.

A atividade de celulasas em solos agrícolas é influenciada por fatores incluindo temperatura, pH, conteúdo de água e oxigênio, quantidade e qualidade de matéria orgânica, mineralogia do solo e ainda presença de elementos traço. Práticas agrícolas como irrigação e aplicação de fertilizantes ou pesticidas podem alterar os processos de agregação, reciclagem de nutrientes e atividades biológicas do solo, fatores estes que regem a produção e estabilidade da enzima celulase neste ambiente (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008; BAKSHI; VARMA, 2011; KHALILI et al., 2011).

Figura 6 – Monitoramento da atividade celulolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pousio (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar (BC) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C)



Fonte: Da autora, 2013

Khalili e colaboradores (2011) realizaram estudo empregando metodologia semelhante, e comparando atividades enzimáticas de solo agrícola e nativo, verificaram que a atividade celulolítica em solo nativo foi superior à encontrada em solo cultivado.

Por outro lado, estudos tem demonstrado que o manejo do solo influencia o acúmulo e a ciclagem do carbono, sendo o sistema de plantio direto um dos tipos de manejo que induzem ao aumento dos teores de carbono orgânico no solo (BAYER et al., 2004). Além disso, a presença de palhada sobre a superfície proporciona maior umidade e menor temperatura do solo, podendo favorecer a atividade microbiana e manutenção de elevada biodiversidade em agrossistemas (BABUJIA et al., 2010).

O histórico de uso do solo agrícola utilizado neste trabalho apresenta um manejo de plantio direto, em sistema de rotação milho-trigo, onde os restos de culturas anteriores permanecem sobre o solo como palhada de cobertura. Este fato está diretamente relacionado aos resultados da análise de solo, que apresenta maior teor de carbono e matéria orgânica em comparação ao solo sob pousio (Tabela 5). É possível assim sugerir, que o tipo de manejo e consequentemente o maior teor de carbono e matéria orgânica do solo agrícola tenha contribuído para a manutenção de micro-organismos adaptados ao uso de resíduos celulósicos para obtenção de energia metabólica, resultando aqui em um nível inicial de atividade celulásica mais elevado neste solo.

O solo agrícola em estudo, quanto incubado a 28 °C na ausência do SI BC (microcosmo controle), apresentou decaimento continuado da atividade celulolítica, alcançando nível nulo após um período de incubação de 28 dias. Já na presença do SI BC (microcosmo de enriquecimento seletivo) foi possível observar um aumento continuado da atividade enzimática, atingindo ponto máximo ($870,9 \mu\text{g glicose g}^{-1} 16\text{h}^{-1}$) após 17 dias de incubação e decaindo gradativamente até alcançar nível nulo após 35 dias (Figura 6a). Este resultado sugere uma rápida resposta da microbiota do solo agrícola ao SI adicionado, corroborando com a hipótese de uma já adaptação da microbiota nativa deste tipo de solo a constantes aportes de material celulósico.

Apesar de o solo agrícola apresentar inicialmente maior atividade celulolítica e uma rápida resposta ao SI adicionado, o solo sob pousio se mostrou mais sensível à introdução do material, o que pôde ser comprovado, por exemplo, pelo maior salto da atividade enzimática como também pela manutenção desta atividade por período superior ao proposto (>35 dias), como observado na Figura 6b.

Na ausência de SI BC, a atividade celulásica do solo sob pousio apresentou decaimento constante, tornando-se nula após 17 dias de incubação. Após a incorporação do SI e incubação a 28 °C, o solo apresentou um período de “adaptação” ao material adicionado, visto ter mantido sua atividade celulolítica inicial praticamente estável por 7 dias (Figura 6b). Imediatamente após esse período, a atividade celulolítica apresentou significativa elevação, alcançando um máximo de atividade ($1053,0 \mu\text{g glicose g}^{-1} 16\text{h}^{-1}$) após 14 dias, seguindo com o decaimento até o final da incubação, sem, contudo, chegar a nível nulo de atividade enzimática como observado para o solo agrícola.

A resiliência funcional em comunidades microbianas já foi descrita, inclusive para solos sob pousio e sob diferentes manejos agrícolas (NANNIPIERI et al., 2003). A estabilidade biológica de comunidades microbianas do solo (considerando a diversidade genética e funcional) sofre influência de diversos fatores, alguns intrínsecos à própria estrutura e diversidade das comunidades microbianas, e outros extrínsecos como a cobertura vegetal, propriedades físico-químicas e qualidade do substrato disponível para a produção de energia metabólica (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013). Desta maneira, mesmo que determinada função não seja predominante no solo, esta função poderá ser prevalente assim que as condições favoráveis à sua ocorrência existam neste ambiente.

A incubação dos microcosmos a 58°C afetou de maneira semelhante a atividade enzimática de ambos os solos. A rápida resposta do solo agrícola à introdução do SI (Figura 6c) e a fase de adaptação ao SI no solo sob pousio (Figura 6d) também foram observadas, porém de maneira menos pronunciada se comparada aos resultados de atividade enzimática nos microcosmos incubados a 28 °C (Figura 6a e 6b).

Os solos agrícola e sob pousio, quando na presença de SI BC e submetidos a 58°C (Figura 6c e 6d) apresentaram picos de atividade celulásica após 7 dias ($594,7 \mu\text{g glicose g}^{-1} 16\text{h}^{-1}$) e 10 dias ($467,9 \mu\text{g glicose g}^{-1} 16\text{h}^{-1}$), respectivamente. A alta temperatura acarretou em diminuição mais rápida dos níveis da atividade celulásica, sendo estas abreviadas para 21 dias no solo agrícola e 24 dias no solo sob pousio, períodos estes inferiores aos observados para temperatura de 28 °C, certamente como consequência do estresse térmico causado a microbiota.

Pouco se sabe ainda sobre a dinâmica de micro-organismos termofílicos em comunidade microbianas complexas. Os resultados apresentados neste trabalho constituem o primeiro relato no Brasil, da atividade enzimática específica de microcosmos montados com solos e incubados sob temperatura favorável ao desenvolvimento de micro-organismos termofílicos. A análise comparativa da diversidade dos isolados mesofílicos e termofílicos obtidos, bem como a confirmação da temperatura ótima de crescimento dos isolados considerados termofílicos, é essencial para concluir sobre os resultados obtidos.

Conforme os resultados apresentados, ambos os solos apresentaram-se positivamente sensíveis à introdução do SI proposto. Em muitos estudos o enriquecimento de amostras de solo com materiais celulósicos estimulou a comunidade celulolítica e conseqüentemente a produção de celulase (SHACKLE; FREEMAN; REYNOLDS, 2000; SAJJAD; LODHI; AZAM, 2002; DOYLE et al., 2006; CENCIANI et al., 2011), sustentando a idéia de que a produção da enzima pode ser uma resposta induzida à presença de seu substrato.

O aumento da atividade celulolítica observado ao longo do período de incubação na presença do SI BC, provavelmente está relacionado a um ou aos dois fatores citados por Hernández e Hobbie (2010): aumento da produtividade enzimática pela comunidade celulolítica já existente nos solos ou ainda como consequência de uma alteração induzida na composição da microbiota.

Sinegani e Mahohi (2010), durante estudo de atividade enzimática em solo, atribuíram o aumento da atividade celulolítica como consequência de alterações nas comunidades microbianas do solo, particularmente ao aumento no número de micro-organismos produtores de celulase.

De acordo com Waldrop, Balser e Firestone (2000), enzimas envolvidas na decomposição de macromoléculas, tais como celulasas, são provavelmente mais sensíveis a alterações na composição da comunidade microbiana do que outras enzimas do solo. A mesma conclusão é apresentada em trabalho realizado por Iyyemperumal e Shi (2008), onde 3 enzimas do solo, dentre estas a celulase, apresentaram correlação direta com a composição da comunidade microbiana.

Cayuela, Sinicco e Mondini (2009) monitoraram por 28 dias a atividade enzimática de um solo agrícola sob condições de enriquecimento com resíduos vegetais (palha e algodão) adicionados a diferentes taxas, visando com isso, avaliar os efeitos da aplicação de resíduos orgânicos nas suas propriedades bioquímicas. Os autores observaram um significativo aumento na biomassa microbiana e na atividade enzimática.

Sajjad, Lodhi e Azam (2002) realizaram, por um período de oito semanas, o monitoramento da atividade enzimática de solo incrementado com três diferentes materiais celulósicos (trigo, milho e sesbânia). A atividade de celulase apresentou aumento ao longo do período de incubação em comparação a amostras do mesmo solo não incrementado, corroborando, portanto, os resultados obtidos neste trabalho.

5.2.2 Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota

Estudos de modelagem da dinâmica da microbiota do solo apontam um efeito cooperativo entre os participantes de comunidades complexas quando fontes de carbono pouco acessíveis – como a celulose – estão disponíveis em grande quantidade (RESAT et al., 2012). Nestas condições, grupos de microorganismos que apresentam capacidade de utilização destes substratos possuem sua população e atividade aumentadas, seguidos por populações de microorganismos não especializados que se beneficiam, por exemplo, dos carboidratos liberados pela ação de enzimas extracelulares.

Neste trabalho, a realização do monitoramento da atividade celulolítica ao longo do período de incubação dos microcosmos permitiu a definição de períodos de incubação na presença do SI BC, considerados favoráveis a obtenção do grupo bacteriano de interesse (produtores de celulase) como mostra Tabela 6. Apesar da metodologia empregada não permitir diferenciação entre a atividade enzimática proveniente de fungos e bactérias, acredita-se que o pico de atividade celulolítica obtido no período de incubação selecionado, seja resultado direto do aumento de populações e/ou atividade de representantes com capacidade de utilização do SI adicionado.

Desta maneira, assumiu-se que o período de incubação ideal para o isolamento de bactérias com alta capacidade para a biossíntese de celulases corresponde ao período onde foi observada a máxima atividade celulolítica nos microcosmos incubados na presença do SI BC. Para fins comparativos, este mesmo período de incubação foi igualmente aplicado para o isolamento de bactérias nos respectivos microcosmos controles.

Como já detalhado, apesar de terem sido realizados isolamentos ao longo de todo o período de monitoramento, somente os isolados referentes ao período de incubação considerado ideal, passaram por etapa de purificação, armazenamento, contabilização e posterior avaliação qualitativa quanto à produção de celulase.

Tabela 6 – Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de celulase

Solo Experimental	Temperatura de Incubação	Período de Incubação ¹
Agrícola	28°C	17 dias
	58°C	7 dias
Sob Pousio	28°C	14 dias
	58°C	10 dias

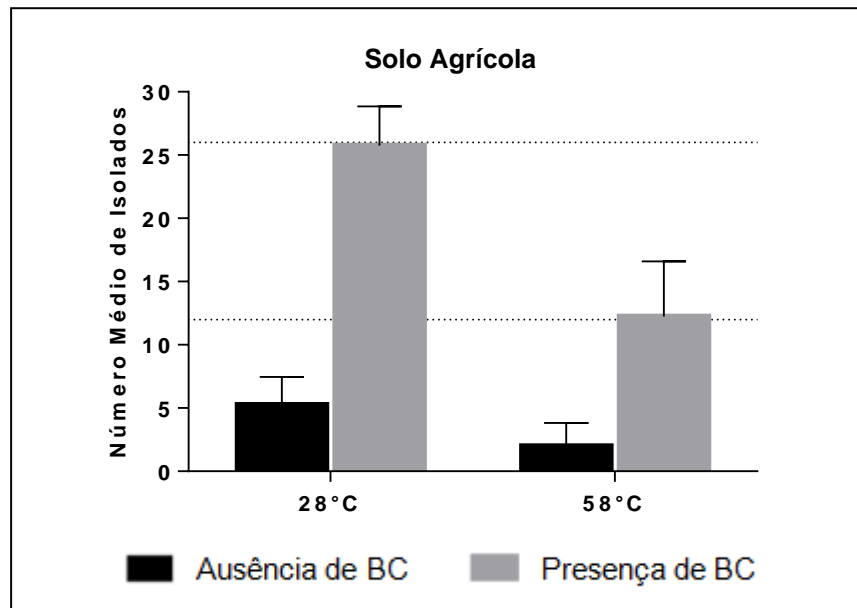
¹ Determinados a partir dos resultados de monitoramento da atividade celulolítica nos microcosmos incubados na presença do SI BC, e aplicados igualmente para os respectivos microcosmos controle

Uma análise comparativa do efeito da adição do SI BC sobre a quantidade média de isolados recuperados em cada um dos microcosmos está apresentada na Figura 7 e o quadro geral dos resultados de isolamento está apresentado no APÊNDICE 3.

Em relação ao solo agrícola, foram obtidos um total de 103 isolados (média de 25,75 isolados por replicata) a partir dos microcosmos incubados a 28 °C na presença de BC, enquanto somente 21 isolados (média de 5,25 isolados por replicata) foram recuperados a partir dos microcosmos incubados na ausência do mesmo (Figura 7a). Estes resultados correspondem a um incremento de 490% no número total de isolados bacterianos obtidos.

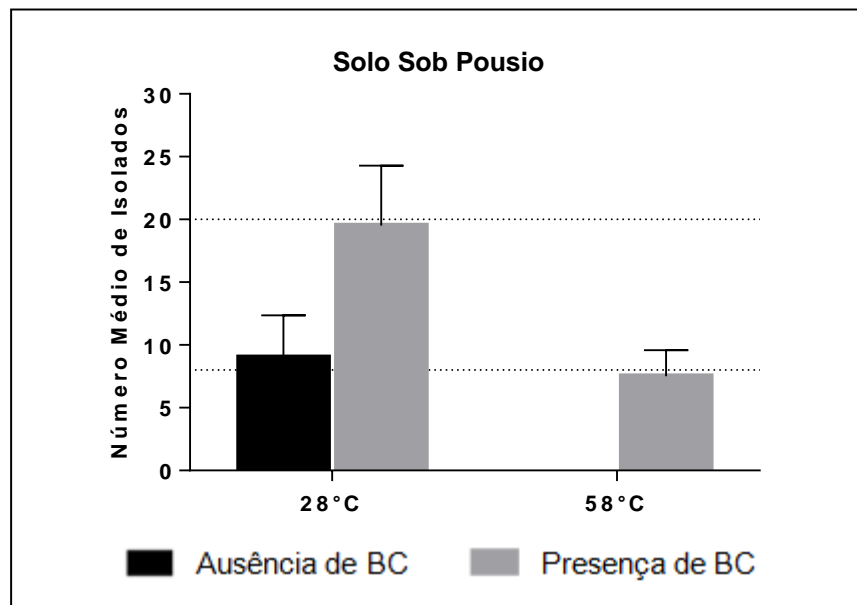
Figura 7 – Efeito do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pousio na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C

a)



Fonte: Da autora, 2013

b)



Fonte: Da autora, 2013

Este mesmo comportamento foi observado para os microcosmos do mesmo solo quando a 58 °C, onde foram obtidos 49 isolados (média de 12,25 isolados por replicata) a partir dos microcosmos incubados na presença de BC, contra um total de 8 isolados (média de 2 isolados por replicata) recuperados a partir dos microcosmos incubados na ausência (Figura 7a), representando um incremento de 613% no número total de isolados bacterianos obtidos.

Já em relação ao solo sob pousio, foram obtidos 78 isolados (média de 19,5 isolados por replicata) a partir dos microcosmos incubados a 28 °C na presença de BC, enquanto 36 isolados (média de 9 isolados por replicata) foram recuperados a partir dos microcosmos incubados na ausência do mesmo (Figura 7b), correspondendo, portanto, a um incremento de 217% no número total de isolados bacterianos. Quando submetidos a 58 °C, os microcosmos na presença de BC permitiram a obtenção de 30 isolados (média de 7,5 isolados por replicata), enquanto na ausência de BC não obteve-se isolados (Figura 7b).

Estes resultados demonstram que o SI BC adicionado aos microcosmos, independentemente da temperatura de incubação, promoveu aumento na densidade de populações do solo, provavelmente pela maior disponibilidade de nutrientes, refletidas aqui na maior quantidade de isolados recuperados.

De maneira geral, a incubação dos microcosmos a 58 °C resultou em um menor número de isolados, provavelmente como resultado do estresse térmico gerado a microbiota. Ainda sim, a adição do SI BC pareceu favorecer a sobrevivência de um maior número de micro-organismos frente à condição estressante, o que pôde ser evidenciado, por exemplo, pelos resultados apresentados pelo solo sob Pousio (Figura 7b), que quando submetido à alta temperatura só permitiu a obtenção de isolados na presença do SI.

Em trabalho realizado por Severino e colaboradores (2004), a adição do bagaço de cana-de-açúcar em solo não acarretou em estímulo sobre a comunidade microbiana, o que foi atribuído pelos autores à alta razão C/N presente no material. Por outro lado, Nakagawa e Andréa (2006) estudando a biorremediação de solo contaminado com Hexaclorobenzeno, destacaram o enriquecimento de amostras deste solo com bagaço de cana-de-açúcar, observando que a adição do material proporcionou aumento da densidade de bactérias e da atividade microbiana. Segundo os autores, apesar de não ter favorecido a degradação do

organoclorado, a adição de bagaço de cana ao solo certamente estimulou a comunidade microbiana ali presente.

Neste estudo, a adição de bagaço de cana-de-açúcar aos solos, sob ambas as temperaturas de incubação, promoveu um claro aumento na atividade microbiana, evidenciado tanto pelo aumento nos níveis de atividade enzimática ao longo do monitoramento, como pelo alto número de isolados obtidos, comparativamente aos microcosmos que não receberam este substrato.

5.2.3 Avaliação Qualitativa da Produção de Celulase

Com o objetivo de confirmar o efeito da adição do bagaço de cana-de-açúcar como estratégia para o enriquecimento da comunidade bacteriana dos solos estudados com representantes ativos na produção de celulases, a coleção de isolados provenientes dos microcosmos contendo SI BC e dos respectivos microcosmos controle foi submetida à avaliação qualitativa.

Micro-organismos produtores de celulase podem ser identificados a partir de meios de cultura contendo celulose como única fonte de carbono. Tal fundamento foi utilizado por Rastogi e colaboradores (2009) para isolar bactérias produtoras de celulase de subsolo de uma mina de ouro. Segundo os autores as condições extremas do local, como a alta temperatura, favoreceram o isolamento de micro-organismos com características de interesse.

A seleção geralmente ocorre em placas de Petri contendo meios sólidos suplementados com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. Este material apresenta-se solúvel em água podendo ser rapidamente degradado, sendo, portanto, um substrato útil e eficiente na detecção da produção de celulases (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977; PERCIVAL ZHANG et al., 2006; MAKI; LEUG; QIN, 2009). As zonas de hidrólise não são facilmente visualizadas sendo necessário o emprego de corantes como iodo de Gram, vermelho congo ou hexadeciltrimetil brometo de amônio (MAKI; LEUG; QIN, 2009).

Outra possibilidade para seleção de bactérias celulolíticas inclui a utilização de substratos fluorescentes como fluoresceína, 4-metil umbeliferona ou resorufina. Uma das principais limitações desses métodos é a instabilidade desses substratos e a difusão dos produtos de hidrólise (MAKI; LEUG; QIN, 2009).

Até o momento, uma variedade de celulases com novas características vem sendo identificadas a partir da utilização de métodos de *screening* em meio sólido (MAKI; LEUG; QIN, 2009). Esses métodos são semi-quantitativos, e estão bem adaptados a avaliação de um grande número de micro-organismos, sendo, portanto aplicáveis ao presente estudo.

Ao longo das avaliações qualitativas, a atividade celulolítica foi evidenciada pela formação de halos claros contrastando com o vermelho do corante selecionado (vermelho congo) na área não degradada, como mostra Figura 8.

Figura 8 – Halo de solubilização característico dos isolados bacterianos que apresentaram atividade celulolítica



Fonte: Da autora, 2013

Os resultados da avaliação qualitativa quanto à produção de celulase aplicada aos isolados bacterianos estão apresentados na Tabela 7. O quadro geral da avaliação está apresentado no APENDICE 3.

Tabela 7 – Efeito do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar no percentual de isolados bacterianos celulolíticos obtidos em microcosmos montados a partir de solo agrícola e solo sob pousio na ausência e presença de SI BC sob temperatura de 28°C e 58°C

Solo	T ¹	Condição ²	Número Isolados		Produtores de Celulase ³		
			Total ⁴	DP ⁵	Total ⁴	DP ⁵	Percentual ⁶
Agrícola	28°C	C/BC	103	± 3,10	60	± 2,16	58,25%
		S/BC	21	± 2,22	10	± 2,08	47,62%
	58°C	C/BC	49	± 4,35	20	± 2,16	40,82%
		S/BC	8	± 1,83	1	± 0,50	12,50%
Sob Pousio	28°C	C/BC	78	± 4,80	51	± 3,30	65,38%
		S/BC	36	± 3,37	8	± 1,83	22,22%
	58°C	C/BC	30	± 2,08	15	± 2,63	50,00%
		S/BC	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A

¹ Temperatura de Incubação do Microcosmo. ² Presença de Substrato Indutor Bagaço de Cana-de-Açúcar (C/BC) ou Ausência de Substrato Indutor Bagaço de Cana-de-Açúcar (S/BC). ³ Conforme Avaliação Qualitativa. ⁴ Total por microcosmo (4 replicatas). ⁵ Desvio Padrão por microcosmo (4 replicatas). ⁶ Obtido pela razão: Total Produtores/Total Isolados. A/I – Ausência de Isolados. N/A – Não Aplicável

Para os microcosmos de ambos os solos incubados na presença do SI BC sob temperatura de 28 °C (Tabela 7) observa-se que mais de 50 % dos isolados obtidos apresentaram-se como celulolíticos, com destaque para o solo sob Pousio que apresentou praticamente dois terços (65,38 %) dos isolados com esta propriedade.

Já em relação aos microcosmos contendo SI BC incubados sob temperatura de 58°C (Tabela 7) os resultados se mostraram inferiores: O solo agrícola e sob Pousio apresentaram 40,82 % e 50,00 % dos isolados, respectivamente, como celulolíticos. Apesar de estarem em menor quantidade, esses isolados tendem a possuir vantagens em relação aos isolados mesofílicos celulolíticos obtidos, podendo apresentar uma propriedade de grande interesse em biocatalíse: a termoestabilidade.

De acordo com Doyle e colaboradores (2006) a microbiota do solo é capaz de produzir celulasas dentro de uma variedade de condições ambientais, tais como altas temperaturas e baixos pHs. Tal afirmação pôde ser comprovada pelos resultados aqui apresentados, uma vez que parte da microbiota dos dois solos mostrou-se celulolítica, sendo capaz de resistir ao pH relativamente baixo encontrado nos solos e a alta temperatura imposta a parte dos tratamentos realizados.

Como já discutido anteriormente, apesar do solo agrícola apresentar inicialmente maior atividade celulolítica, o solo sob Pousio se mostrou mais sensível à introdução do SI BC, o que pode estar relacionado aqui, à maior porcentagem de bactérias celulolíticas identificadas nos microcosmos montados com este solo.

A presença de isolados com atividade celulolítica nos microcosmos controle (ausência de BC), confirmam a existência prévia dessa classe funcional na comunidade nativa dos solos experimentais, conforme já havia sido indicado na etapa de monitoramento enzimático (Figura 6), onde todos os microcosmos controle também apresentaram atividade celulolítica.

A comparação dos resultados da avaliação qualitativa para os dois solos na condição de microcosmo controle (Tabela 7) também corrobora com os resultados do monitoramento enzimático (Figura 6), onde o solo agrícola apresentou inicialmente maior atividade celulolítica frente ao solo sob pousio, refletindo aqui em um maior número de isolados celulolíticos nos microcosmos controle montados a partir deste solo. A 28 °C, o microcosmo controle de solo agrícola apresentou 47,62 % dos isolados como celulolíticos, enquanto o de solo sob pousio apresentou 22,22 % com tal propriedade. O mesmo comportamento foi verificado sob temperatura de 58°C, onde o microcosmo controle de solo agrícola apresentou novamente percentual de isolados celulolíticos superior ao de solo sob pousio.

Também conforme indicado ao longo do monitoramento enzimático, apesar do solo agrícola apresentar inicialmente maior atividade celulolítica, o solo sob pousio se mostrou mais sensível a introdução do SI BC. Este resultado está em conformidade com os resultados da avaliação qualitativa (Tabela 7), onde o solo sob pousio se destacou pela significativa incrementação no percentual de isolados celulolíticos: quando a 28°C na ausência de BC (microcosmo controle), o solo sob pousio apresentou 22,22 % dos isolados como celulolíticos, com a introdução do SI

ao solo, este percentual atingiu 65,38 %. Já para o solo agrícola essa incrementação mostrou-se menos significativa, passando de um percentual de 47,62 % para 58,25%.

Observa-se que para nenhum dos solos, em nenhuma das temperaturas testadas, os microcosmos controle apresentaram maior percentual de isolados celulolíticos frente aos microcosmos na presença de BC (Tabela 7), o que confirma o papel do substrato indutor proposto, não só na obtenção de um maior número de isolados, mas principalmente na obtenção do grupo bacteriano de interesse. Fica evidente que a adição do substrato indutor BC aos microcosmos promoveu modificações na comunidade microbiana dos solos, garantindo a obtenção de um maior percentual de isolados celulolíticos.

É possível verificar que o número de isolados por replicata de cada microcosmo permitiu valores pequenos para desvio padrão, indicando que os valores obtidos tendem a refletir reais modificações nas comunidades bacterianas em resposta aos tratamentos de enriquecimento seletivo. A análise de diversidade molecular dos isolados irá fornecer subsídios mais confiáveis para uma conclusão sobre estes resultados.

Todos os isolados tomados como celulolíticos ao longo da avaliação qualitativa tiveram seus halos de degradação avaliados a partir do parâmetro índice enzimático (IE). Os que se destacaram foram aqueles que apresentaram IE superior a 3,0, estando alguns representados nos APÊNDICES 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR FARELO DE SOJA NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PROTEOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSIO

5.3.1 Monitoramento da Atividade Proteolítica

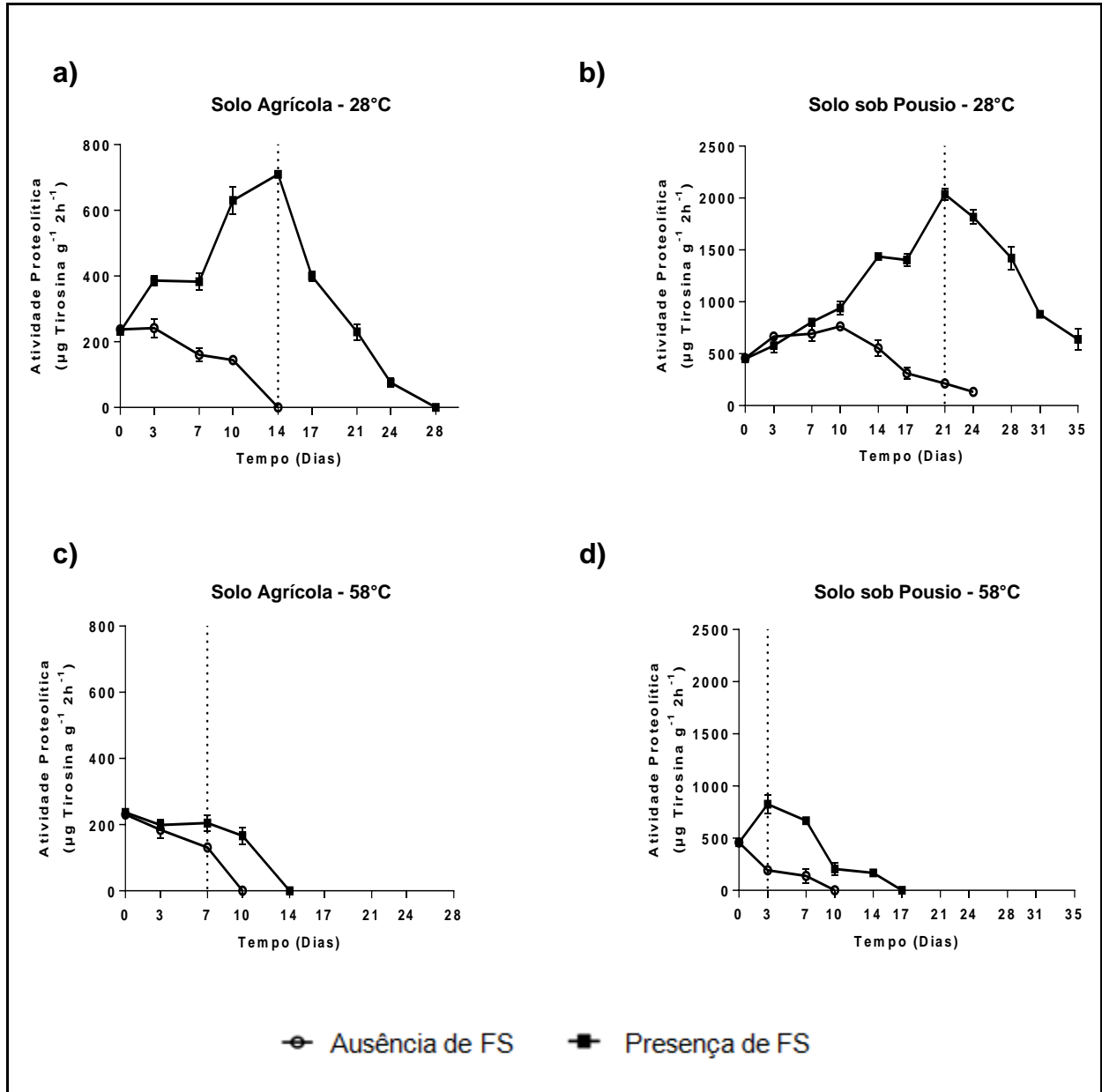
A atividade proteolítica também foi monitorada nos microcosmos de solo agrícola e solo sob pousio quando na ausência e presença do SI FS sob duas diferentes temperaturas de incubação, visando identificar os efeitos de tal substrato na estimulação/prospecção das comunidades microbianas proteolíticas presentes, estando os resultados apresentados na Figura 9.

Brzostek e Finzi (2011) atribuem a atividade proteolítica em solos à interação entre três parâmetros: a temperatura do solo, disponibilidade de substrato suscetível a assimilação, e ao tamanho do reservatório dessas enzimas. Os fatores que alteram de alguma forma a combinação destes três parâmetros deve alterar a atividade proteolítica e conseqüentemente, a disponibilidade de N no solo. De acordo com Narasimha, Sridevi, Reddy, Reddy (2011) o monitoramento da atividade proteolítica pode ser um sensível indicador da atividade microbiana em solos.

Uma análise comparativa geral da atividade proteolítica dos solos na condição inicial (ausência de SI FS, em $t=0$), ainda sem o efeito da temperatura de incubação, possibilita observar que o solo sob pousio apresentou maior atividade proteolítica comparativamente ao solo agrícola. A incorporação do SI FS favoreceu o aumento da atividade proteolítica nos dois solos em estudo, sendo que o solo sob pousio novamente se mostrou mais sensível frente à adição do material, com aumentos mais significativos de atividade.

O solo agrícola em estudo, quando incubado na presença do SI FS a 28°C, apresentou pico na atividade proteolítica ($709,6 \mu\text{g Tirosina g}^{-1} 2\text{h}^{-1}$) após 14 dias (Figura 9a), sendo que neste momento já não foi encontrada atividade proteolítica no microcosmo controle (ausência de SI FS). Quando submetido a 58°C, o substrato indutor favoreceu a manutenção da atividade proteolítica por período superior ao apresentado pelo microcosmo controle (Figura 9c), entretanto não foi suficiente para ocasionar aumento significativo na atividade originalmente encontrada, a qual foi abreviada para 14 dias de incubação.

Figura 9 – Monitoramento da atividade proteolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pousio (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor farelo de soja (FS) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C)



Fonte: Da autora, 2013

Já o solo sob pousio, quando incubado a 28°C na presença do SI FS, apresentou pico na atividade proteolítica após 21 dias (2037,4 µg Tirosina g⁻¹ 2h⁻¹), sendo capaz de mantê-la (em decaimento gradativo) por período superior a 35 dias (Figura 9b). A temperatura citada também estimulou a atividade proteolítica no microcosmo controle, neste caso a atividade apresentou aumento continuado até o décimo dia, decaindo aproximadamente em 24 dias (Figura 9b). A incubação a 58°C

na presença do SI resultou em um comportamento diferenciado deste solo: Favoreceu um rápido aumento da atividade proteolítica, atingindo um pico de 823,6 μg Tirosina g^{-1} 2h^{-1} após três dias de incubação (Figura 9d), entretanto, a partir deste período, a atividade apresentou decaimento, sendo abreviada para 17 dias.

A soja inclui em sua composição proteínas, lipídeos, carboidratos complexos, oligossacarídeos, fibras solúveis e insolúveis, minerais, vitaminas e fitoquímicos. Sua maior composição está certamente nas proteínas (cerca de 40%, sendo a maioria globulinas), existindo uma relação inversa entre os teores de proteínas e os de lipídeos e carboidratos, ou seja, variedades com maior teor proteico têm menor quantidade de óleos e carboidratos. Em relação ao farelo de soja, a indústria pode produzir três tipos com base no teor de proteína bruta, podendo variar de 44 a 48% (DE PARIS, 2008).

O aumento na atividade proteolítica em ambos os solos na presença do SI Farelo de Soja ocorreu, possivelmente, devido à estimulação da atividade microbiana, como resultado da maior disponibilidade de recursos nutricionais, ou ainda, atribuído, especialmente, ao alto teor de N presente em tal substrato. De acordo com Tejada, Hernandez, Garcia (2006) materiais com elevados teores de N são degradados rapidamente, favorecendo o desenvolvimento microbiano e a atividade enzimática em solos.

Tal avaliação está de acordo com os estudos realizados por Pascual, Hernandez, Garcia, Ayuso (1997); Silva e colaboradores (1998); Ros e colaboradores (2006); Cayuela, Sinicco e Mondini (2009) e Pradeep e Narasimha (2012) que demonstraram uma melhoria significativa da atividade proteolítica em solos após introdução de materiais ricos em N.

Silva e colaboradores (1998) avaliaram a atividade proteolítica de um latossolo acrescido de diferentes taxas de material proteico (gelatina). Passados 45 dias do processo de enriquecimento, os autores encontram uma relação linear entre a atividade proteolítica e a taxa de material proteico adicionada. Segundo os autores, o material é altamente suscetível a mineralização e pôde ser utilizado como fonte de energia, favorecendo o crescimento da população microbiana.

Cayuela, Sinicco e Mondini (2009) monitoraram por um período de 28 dias a atividade enzimática de solo agrícola incrementado também com materiais proteicos como farinha de osso\carne e farinha de sangue, adicionados a diferentes

taxas. Os autores verificaram significativo aumento na biomassa microbiana e atividade proteolítica em relação aos respectivos tratamentos controles (ausência dos materiais proteicos). Para ambos os materiais, o aumento da atividade proteolítica foi proporcional às taxas adicionadas, indicando o papel indutor dos substratos proteicos, o que corrobora com os resultados do presente estudo.

Pascual, Hernandez, Garcia e Ayuso (1997) monitoraram durante 360 dias a atividade proteolítica de solo acrescido de resíduos sólidos urbanos e/ou lodo de esgoto. As atividades encontradas foram significativamente maiores do que aquelas observadas em amostras do mesmo solo na ausência de tais resíduos. Entre os dois materiais, destacou-se o lodo de esgoto, certamente pelo seu maior nível proteico.

A diminuição da atividade proteolítica ao longo dos períodos de incubação, no presente estudo, pode ser atribuída à competição da comunidade proteolítica frente ao SI adicionado, pela rápida degradação/eliminação do substrato de interesse (proteínas) e pela consequente escassez de nutrientes, uma vez que, segundo Ros, Hernandez e García (2003), estes substratos são facilmente consumidos. Um outro fator a ser considerado seria a liberação de substâncias tóxicas resultante do metabolismo dos micro-organismos existentes.

5.3.2 Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota

A realização do monitoramento da atividade proteolítica ao longo do período de incubação dos microcosmos permitiu a definição de períodos de incubação na presença do SI FS, considerados favoráveis a obtenção do grupo bacteriano de interesse (produtores de protease) como mostra Tabela 8. Acredita-se que o pico de atividade proteolítica referente ao período de incubação selecionado, seja resultado direto do aumento de populações e/ou atividade de representantes com capacidade de utilização do SI adicionado.

Desta maneira, assumiu-se que o período de incubação ideal para o isolamento de bactérias com alta capacidade para a biossíntese de protease corresponde ao período onde foi observada a máxima atividade proteolítica nos microcosmos incubados na presença do SI FS.

Tabela 8 – Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de protease

Solo Experimental	Temperatura	Período de Incubação ¹
Agrícola	28°C	14 dias
	58°C	7 dias
Sob Pousio	28°C	21 dias
	58°C	3 dias

¹ Determinados a partir dos resultados de monitoramento da atividade proteolítica nos microcosmos incubados na presença do SI FS, e aplicados igualmente para os respectivos microcosmos controle

Uma análise comparativa do efeito da adição do SI FS sobre a quantidade média de isolados recuperados em cada um dos microcosmos está apresentada na Figura 10 e o quadro geral dos resultados de isolamento está apresentado no APÊNDICE 10.

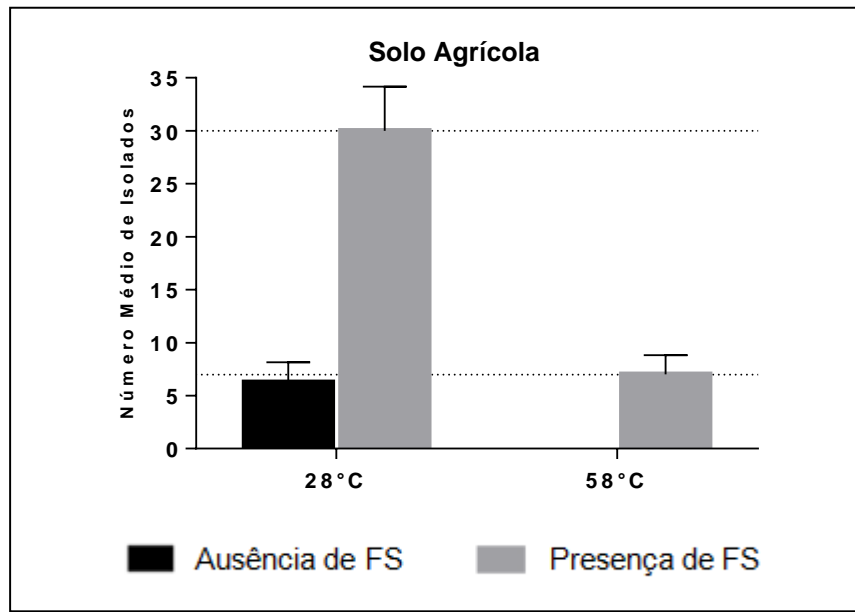
Conforme os resultados, verifica-se que a introdução do SI FS aos solos também favoreceu a obtenção de um maior número de isolados bacterianos frente aos microcosmos controle, independentemente da temperatura de incubação imposta.

Em relação ao solo agrícola foram obtidos um total de 120 isolados (média de 30 isolados por replicata) a partir dos microcosmos incubados a 28 °C na presença de FS, enquanto somente 25 isolados (média de 6,25 isolados por replicata) foram recuperados a partir do respectivo microcosmo controle (Figura 10a). Estes resultados correspondem a um incremento de 480% no número total de isolados bacterianos obtidos, atribuído à entrada do SI.

Entretanto a observação de maior relevância entre os resultados apresentados refere-se ao solo agrícola incubado a 58°C (Figura 10a), que quando na ausência do Farelo de Soja não permitiu a obtenção de isolados, enquanto na presença, apresentou um total de 28 (média de 7 isolados por replicata), sugerindo, assim como já sugerido na etapa de monitoramento enzimático (Figura 9c), uma relação entre o SI adicionado e a sobrevivência de parte da microbiota ao estresse resultante da alta temperatura.

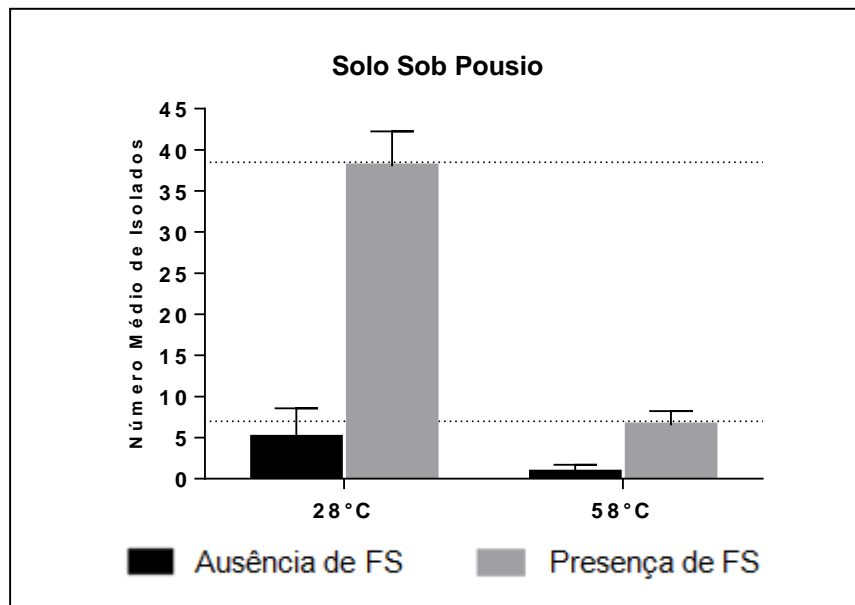
Figura 10 – Efeito do substrato indutor farelo de soja no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pouso na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C.

a)



Fonte: Da autora, 2013

b)



Fonte: Da autora, 2013

O maior número de isolados foi obtido a partir do microcosmo de solo sob pousio incubado a 28°C na presença do SI FS (Figura 10b), apresentando um total de 152 isolados (média de 38 isolados por replicata), enquanto somente 20 (média de 5 isolados por replicata) foram recuperados a partir do microcosmo controle, representando um incremento de 760% no número total de isolados.

Um percentual de incrementação ainda maior foi observado para o mesmo solo incubado a 58°C (Figura 10b). Em microcosmo na presença de SI FS, foram obtidos 26 isolados (média de 6,5 isolados por replicata) enquanto 3 (média de 0,75 isolados por replicata) foram recuperados do respectivo microcosmo controle, representando um aumento de 867% no número total de isolados bacterianos obtidos.

Pereira, Neves e Gava (2000) também avaliaram o efeito da soja na dinâmica da população microbiana em dois diferentes solos. Em ambos, a soja estimulou a população bacteriana, corroborando com os resultados do presente estudo. Ros e colaboradores (2006) verificaram que a aplicação de compostos orgânicos em solo estimulou as atividades enzimáticas, inclusive a de protease. Segundo os autores, a diversidade bacteriana, foi significativamente maior nos tratamentos de solo sob condições de enriquecimento quando comparado aos tratamentos controles.

No presente estudo, acredita-se também que boa parte dos resultados, como por exemplo, o maior número de isolados nos microcosmos sob condições de enriquecimento seletivo, seja consequência de modificações na diversidade das comunidades bacterianas, ocasionadas pela incorporação do SI ao solo, entretanto somente técnicas de biologia molecular serão capazes de comprovar tal hipótese.

5.3.3 Avaliação Qualitativa da Produção de Protease

Com o objetivo de confirmar o efeito da adição do farelo de soja como estratégia para o enriquecimento da comunidade bacteriana dos solos estudados com representantes ativos na produção de protease, a coleção de isolados provenientes dos microcosmos contendo SI FS e dos respectivos microcosmos controle (para fins comparativos) foi submetida à avaliação qualitativa.

A seleção de micro-organismos proteolíticos presentes em solo pode ser realizada em meio sólido suplementado com um substrato proteico funcionando como fonte de carbono e nitrogênio. Dentre esses substratos é citado a caseína (meio ágar- caseína), gelatina (meio ágar-gelatina) e leite desnatado (meio ágar-leite desnatado) (KUMAR, TAKAGI, 1999). Em ambos os casos a atividade proteolítica é evidenciada por halos claros ao redor das colônias (zonas de hidrólise).

Kumar e Takagi (1999) defendem o enriquecimento prévio de amostras de solo visando o isolamento e *screening* de micro-organismos proteolíticos, o que foi realizado no presente estudo.

Para avaliação qualitativa dos isolados bacterianos quanto a produção de protease, optou-se pela utilização do meio ágar-leite desnatado. A produção da enzima foi evidenciada pela formação de halos transparentes ao redor dos orifícios de inoculação, contrastando com o branco do meio sólido como mostra Figura 11.

Figura 11 – Halo de solubilização característico dos isolados bacterianos que apresentaram atividade proteolítica



Fonte: Da autora, 2013

Tang, Pan, Li e He (2008) realizaram o isolamento e *screening* de bactérias do solo tolerante a solventes orgânicos para produção de uma protease. O teste quanto à produção da enzima foi realizado também em meio ágar leite-desnatado. Os micro-organismos que apresentaram zonas claras amplas ao redor da colônia foram considerados com alto potencial proteolítico.

Os resultados da avaliação qualitativa quanto à produção de protease, aplicada aos isolados bacterianos estão apresentados na Tabela 9. O quadro geral da avaliação esta apresentado no APENDICE 10.

Tabela 9 – Efeito do substrato indutor farelo de soja no percentual de isolados bacterianos proteolíticos obtidos em microcosmos montados a partir de solo agrícola e solo sob pousio na ausência e presença de SI FS sob temperatura de 28°C e 58°C

Solo	T ¹	Condição ²	Número Isolados		Produtores de Protease ³		
			Total ⁴	DP ⁵	Total ⁴	DP ⁵	Percentual ⁶
Agrícola	28°C	C/FS	120	± 4,16	72	± 2,94	60,00%
		S/ FS	25	± 1,89	7	± 1,26	28,00%
	58°C	C/ FS	28	± 1,83	23	± 1,26	82,14%
		S/ FS	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A
Sob Pousio	28°C	C/ FS	152	± 4,24	115	± 5,85	75,66%
		S/ FS	20	± 3,56	10	± 3,00	50,00%
	58°C	C/ FS	26	± 1,73	17	± 3,10	65,38%
		S/ FS	3	± 0,96	N/D	N/A	N/A

¹ Temperatura de Incubação do Microcosmo. ² Presença de Substrato Indutor Farelo de Soja (C/FS) ou Ausência de Substrato Indutor Farelo de Soja (S/FS). ³ Conforme Avaliação Qualitativa. ⁴ Total por microcosmo (4 replicatas). ⁵ Desvio Padrão por microcosmo (4 replicatas). ⁶ Obtido pela razão: Total Produtores/Total Isolados. A/I – Ausência de Isolados. N/D – Atividade Proteolítica não Detectada. N/A – Não Aplicável

Atualmente, pouco se sabe sobre a composição e dinâmica das comunidades bacterianas proteolíticas em ambientes naturais como o solo. O que se sabe é que manipulações ambientais, como a introdução de materiais orgânicos, impactam tais propriedades (FUKA et al. 2009).

Com base nos resultados apresentados (Tabela 9), o SI farelo de soja cumpriu com o objetivo proposto de estimular a comunidade proteolítica nos solos. Os resultados apresentaram-se satisfatórios para todos os microcosmos de enriquecimento seletivo, com frações de isolados proteolíticos obtidos iguais ou superiores a 60%.

O resultado de maior relevância refere-se ao solo agrícola, que quando incubado na presença do SI FS sob temperatura de 58°C, apresentou

82,14% dos isolados como proteolíticos, os quais podem ser considerados candidatos a termoestabilidade. O mesmo é esperado para os 65,38% isolados proteolíticos do solo Sob Pousio, que resistiram também à alta temperatura. Em contrapartida, os respectivos microcosmos controle dos dois solos, quando submetidos à alta temperatura, não permitiram se quer a obtenção de isolados, o que reforça o papel do substrato indutor no sucesso desses resultados.

Apesar da etapa de monitoramento da atividade proteolítica (Figura 9) ter indicado o solo sob pousio como o mais sensível à introdução do SI FS, a etapa de avaliação qualitativa (Tabela 9) apontou o solo agrícola como o mais afetado: quando a 28°C na ausência de FS (microcosmo controle), o solo agrícola apresentou 28,00% dos isolados como proteolíticos, com a introdução do material ao solo (microcosmo de enriquecimento seletivo), passou a apresentar 60,00%. Já para o solo sob pousio, essa incrementação mostrou-se menos significativa, passando de um percentual de 50,00% (microcosmo controle) para 75,66% (microcosmo de enriquecimento seletivo).

Em relação aos resultados dos microcosmos controle (ausência de FS) submetidos a 28°C, apesar do menor número de isolados, boa parte apresentou-se como proteolítica (Tabela 9). Este resultado confirma também a existência prévia dessa classe funcional de micro-organismos nos dois solos experimentais, conforme já indicado na etapa de monitoramento enzimático (Figura 9).

Entre os microcosmos controle, o de solo sob pousio demonstrou melhores resultados, apresentando 50,00% dos isolados como proteolíticos, o que sugere o potencial deste tipo de solo, mesmo na ausência de substrato indutor, na obtenção dessa classe de micro-organismos. O maior percentual proteolítico apresentado para o microcosmo controle de solo sob pousio corrobora os resultados do monitoramento enzimático (Figura 9), onde este solo mostrou inicialmente maior atividade proteolítica.

Todos os isolados tomados como proteolíticos ao longo da avaliação qualitativa tiveram seus halos de degradação avaliados a partir do parâmetro índice enzimático (IE). Os que se destacaram foram aqueles que apresentaram IE superior a 3,0, estando alguns apresentados nos APÊNDICES 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO INDUTOR FARELO DE CRISÁLIDA NA ESTIMULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA QUITINOLÍTICA EM SOLO AGRÍCOLA E SOLO SOB POUSIO

5.4.1 Monitoramento da Atividade Quitinolítica

A atividade quitinolítica também foi monitorada nos microcosmos de solo agrícola e solo sob pousio quando na ausência e presença do SI FC sob duas diferentes temperaturas de incubação, visando identificar os efeitos de tal resíduo na estimulação/prospecção das comunidades microbianas quitinolíticas presentes, estando os resultados apresentados na Figura 12.

Uma análise comparativa geral da atividade quitinolítica dos solos na condição inicial (ausência de SI FC, em $t=0$), ainda sem o efeito da temperatura de incubação, possibilita observar que o solo sob pousio apresentou maior atividade quitinolítica comparativamente ao solo agrícola, o que poderia ser explicado por uma maior quantidade de quitina originalmente disponível neste tipo de solo.

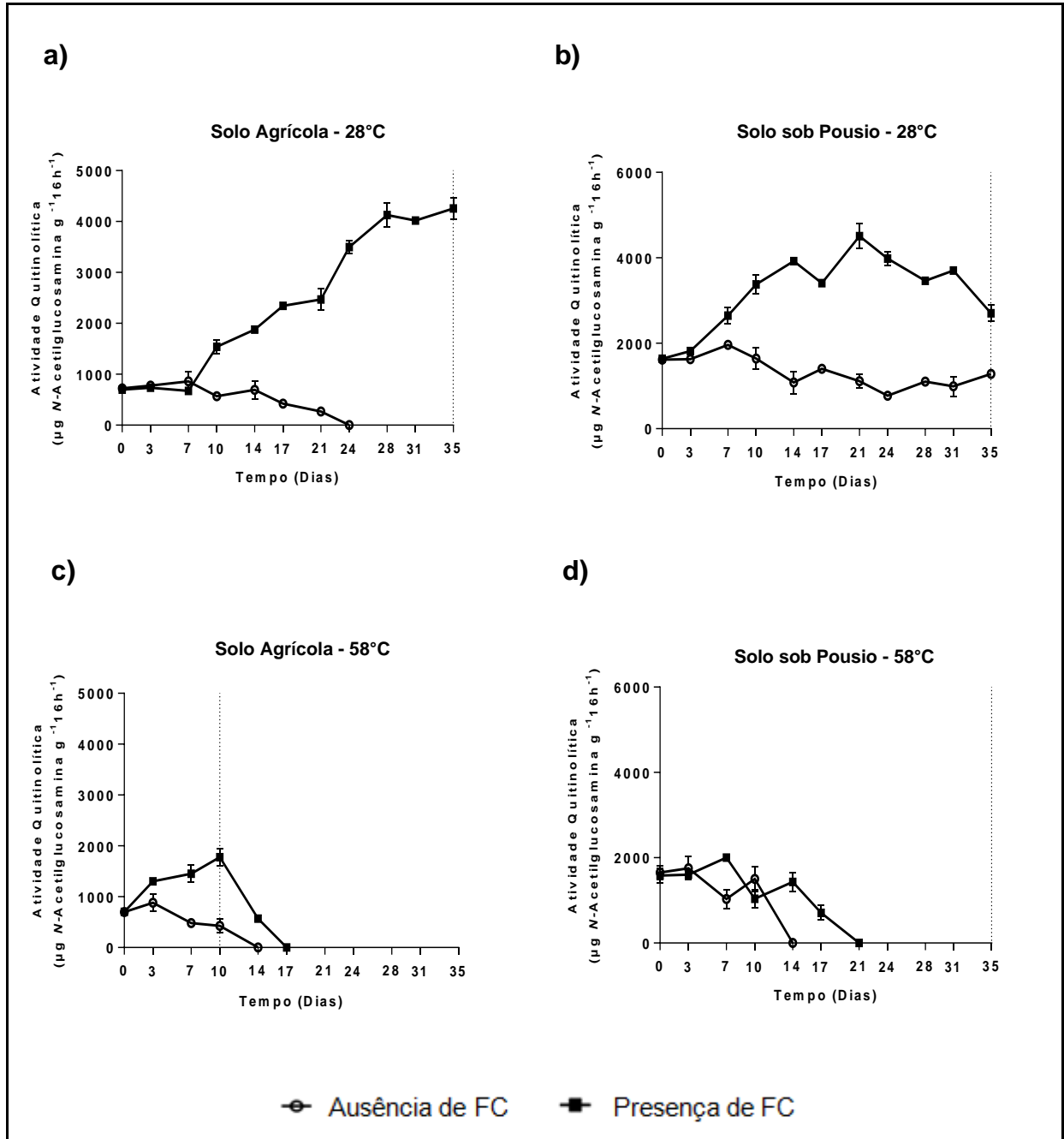
Apesar da menor atividade quitinolítica inicialmente apresentada, o solo agrícola quando incubado a 28°C mostrou-se altamente sensível à incorporação do SI FC, com aumento continuado da atividade quitinolítica por período superior a 35 dias (Figura 12a), não sendo possível, portanto, observar dentro deste período, um pico de atividade enzimática. Já quando incubado a 58°C na presença do SI, o mesmo solo apresentou pico de atividade ($1777,5 \mu\text{g N-acetilglicosamina g}^{-1}\text{16h}^{-1}$) após 10 dias de incubação, decaindo totalmente aos 17 dias (Figura 12c).

Em relação aos microcosmos controle deste solo, observa-se que quando incubados a 28°C e 58°C, os mesmos tiveram suas atividades quitinolíticas abreviadas para 24 dias (Figura 12a) e 14 dias (Figura 12c), respectivamente.

Esses resultados sugerem o efeito de estimulação do resíduo farelo de crisálida para a atividade quitinolítica do agrossistema, efeito esse, atribuído provavelmente ao principal constituinte do SI adicionado: a quitina.

A crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) é um resíduo da indústria têxtil, portanto, de baixo custo. Além da quitina em sua composição, possui também alto teor protéico e sais minerais como cálcio, fósforo, cobre, ferro, manganês e zinco (ITANO, 2006).

Figura 12 – Monitoramento da atividade quitinolítica em amostras de solo agrícola (a, c) e de solo sob pouso (b, d) na ausência (○) e presença (■) do substrato indutor farelo de crisálida (FC) sob diferentes temperaturas de incubação (28 °C e 58 °C)



Fonte: Da autora, 2013

De acordo com Gomes e colaboradores (1999) e Hernández e Hobbie (2010) a produção de quitinase em solos é geralmente induzida pela presença de quitina.

Em estudo realizado por Wongkaew e Homkratoke (2009) a adição de quitina em solo permitiu que a atividade quitinolítica do mesmo fosse elevada a um nível capaz de ser mantido durante longo período (12 semanas), ao contrario dos tratamentos controle (ausência de quitina), que apresentaram atividades inferiores mantidas por tempo consideravelmente menor (1 semana).

Kielak e colaboradores (2013) também avaliaram o impacto da quitina (resíduo de camarão) na atividade quitinolítica de solo. Os autores realizaram o monitoramento enzimático após 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de incubação. Ao longo de todo o experimento, os tratamentos que não continham quitina apresentaram atividades quitinolíticas inferiores.

Em relação aos resultados do solo sob pousio, apesar da maior atividade quitinolítica encontrada para os microcosmos contendo SI, o monitoramento enzimático não foi considerado satisfatório, visto ter apresentado sucessivas quedas e aumentos de atividade (Figura 12b e Figura 12d). Portanto, considerando a inconsistência dos resultados, não foi possível uma conclusão a respeito do efeito do SI FC na atividade quitinolítica deste solo.

5.4.2 Isolamento, Purificação, Contabilização e Avaliação da Microbiota

Durante a realização do monitoramento da atividade quitinolítica em solo agrícola incubado com FC sob temperatura de atuação 28°C, observou-se aumento progressivo da atividade por período superior ao período proposto de incubação (35 dias) (Figura 12a), não sendo possível determinar um tempo considerado ideal (pico na atividade quitinolítica) à obtenção do grupo bacteriano de interesse (produtores de quitinase). Portanto, para este solo, nesta temperatura, optou-se pelo isolamento após o período limite de 35 dias. Para o mesmo solo, entretanto à 58°C, foi possível a visualização de um pico na atividade enzimática.

Já em relação ao solo sob Pousio, o monitoramento da atividade quitinolítica apresentou-se insatisfatório, não sendo possível obter (para ambas as temperaturas) tempos considerados ideais ao isolamento. Portanto, novamente, optou-se pelo isolamento em período de 35 dias.

Todos os períodos de incubação selecionados para a etapa de isolamento estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Períodos de incubação considerados ideais para a obtenção de bactérias mesofílicas e termofílicas com capacidade de biossíntese de quitinase

Solo Experimental	Temperatura	Período de Incubação
Agrícola	28°C	35 dias ¹
	58°C	10 dias ¹
Sob Pousio	28°C	35 dias ²
	58°C	35 dias ²

¹ Determinado a partir do resultados de monitoramento da atividade quitinolítica no microcosmo incubado na presença do SI FC, e aplicado igualmente para o respectivo microcosmo controle. ² Período padronizado para o isolamento nos microcosmos que não apresentaram resultado satisfatório na etapa de monitoramento enzimático

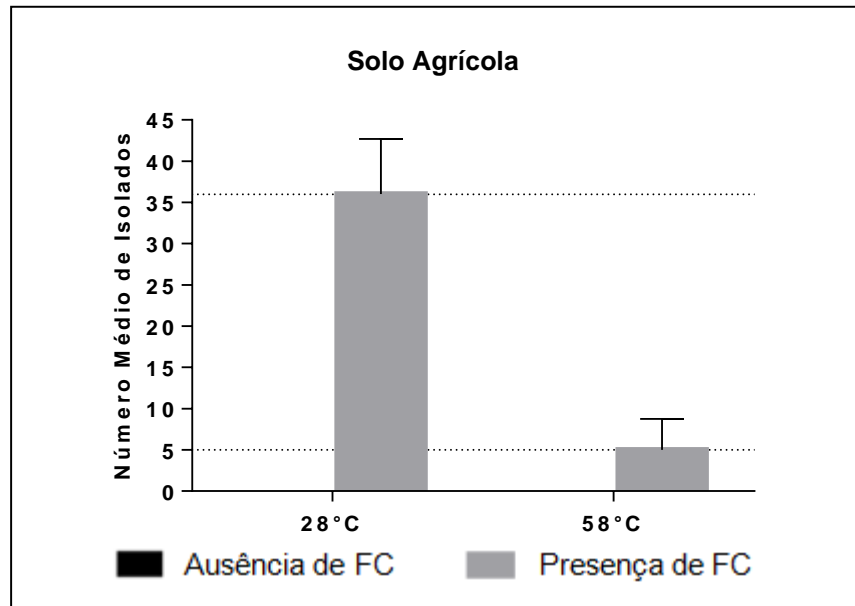
Uma análise comparativa do efeito da adição do SI FC sobre a quantidade média de isolados recuperados em cada um dos microcosmos está apresentada na Figura 13 e o quadro geral dos resultados de isolamento está apresentado no APÊNDICE 17.

A incrementação de solos com quitina vem atualmente visando o controle de fungos fitopatogênicos, devido à capacidade do material alterar a microbiota do solo, estimulando, por exemplo, a multiplicação de micro-organismos quitinolíticos (HALLMANN; RODRÍGUEZ-KÁBANA; KLOEPPER, 1999; WONGKAEW; HOMKRATOKE, 2009).

Esta incrementação pode ser vista também não só pelos efeitos de proteção às plantas, mas também pela possibilidade de proporcionar ciclagem de nutrientes para benefício dos micro-organismos no solo. Segundo Wongkaew e Homkratoke (2009), a quitina exibe combinação de características físico-químicas e biológicas de baixa toxicidade, sendo uma alternativa viável no aprimoramento das atividades microbianas em solos.

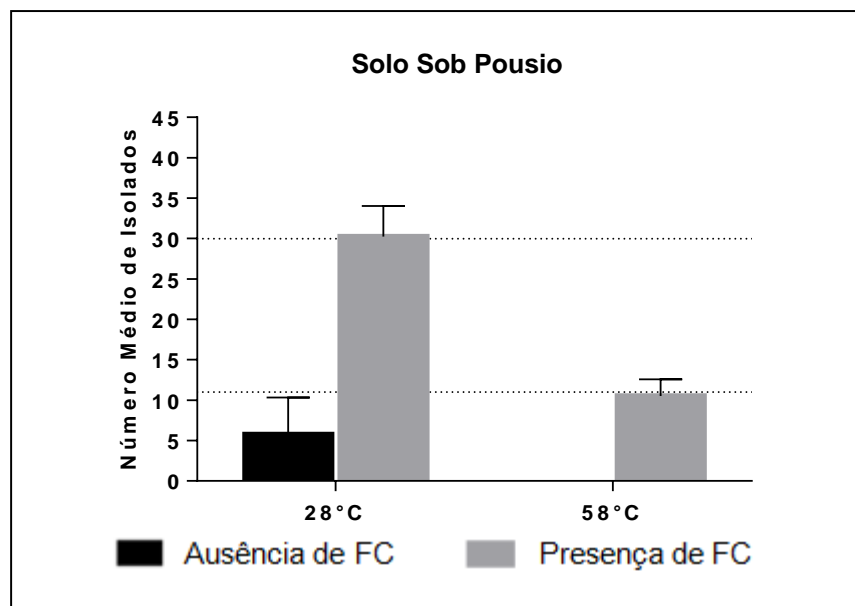
Figura 13 – Efeito do substrato indutor farelo de crisálida no número médio de isolados bacterianos obtidos em microcosmos montados a partir de a) Solo agrícola na ausência e presença de SI FC sob temperatura de 28°C e 58°C e b) Solo sob pousio na ausência e presença de SI FC sob temperatura de 28°C e 58°C

a)



Fonte: Da autora, 2013

b)



Fonte: Da autora, 2013

Conforme os resultados apresentados, não foi possível a obtenção de isolados no microcosmos controle de solo agrícola, quando a 28°C. Essa ausência pode ser atribuída ao longo período de incubação (35 dias) que precedeu a etapa de isolamento. A microbiota não teria sido capaz de resistir à ausência de fontes nutritivas. Em contrapartida, a adição do SI FC ao solo favoreceu a sobrevivência e possivelmente gerou uma estimulação da microbiota, obtendo-se um total de 144 isolados (média de 36 isolados por replicata) a partir do microcosmo de enriquecimento seletivo (Figura 13a).

A idéia de estimulação citada acima baseia-se em uma comparação com o SI BC (Figura 7a) e FS (Figura 10a), que quando atuando no mesmo solo a 28°C, por menores períodos de tempo (17 e 14 dias respectivamente), favoreceram a obtenção de um menor número de isolados, sugerindo que para a microbiota do agrossistema, o farelo de crisálida teve sua maior contribuição.

Uma outra possibilidade para justificar o maior número de isolados obtido em solo agrícola na presença do farelo de crisálida frente aos outros SI seria não relacionada a natureza do SI adicionado, mas sim ao maior período de incubação que precedeu a etapa de isolamento (35 dias) e conseqüentemente ao maior tempo para adaptação e/ou modificação da comunidade microbiana existente.

Em relação ao solo sob pousio, é possível verificar que houve a obtenção de isolados do microcosmo controle, quando este foi submetido a 28°C (Figura 13b). Estes micro-organismos destacam-se pela sobrevivência por período mínimo de 35 dias, mesmo na falta de entradas de nutrientes, sugerindo um importante papel desses micro-organismos para o solo de origem.

Os isolados obtidos em ambos os solos na presença do SI FC sob temperatura de atuação de 58°C apresentam-se como candidatos a termoestabilidade, principalmente os provenientes de solo sob pousio, os quais sobreviveram por 35 dias nesta condição estressante.

Assim como os resultados da etapa de monitoramento enzimático, os resultados de isolamento obtidos também devem estar relacionados ao principal componente do SI adicionado. Hallmann, Rodríguez-Kábana e Kloepper (1999) observaram em estudo, que as populações bacterianas responderam muito mais rapidamente a adição de quitina em solos do que fungos. Os autores verificaram que a incrementação de amostras de solo com quitina resultou em um aumento na

população bacteriana (30 vezes maior, passados 21 dias da incrementação) e inclusive em um aumento na fração quitinolítica em relação ao mesmo solo na ausência de quitina (tratamento controle).

Na análise comparativa da diversidade bacteriana realizada também no estudo acima citado, foi possível verificar que todas as espécies presentes nas amostras de solo não incrementado (tratamento controle) estavam também presentes em solo incrementado com quitina, entretanto, algumas espécies como *Aureobacterium testaceum*, *Corynebacterium aquaticum* e *Rathayibacter tritici* foram obtidas apenas após o processo de incrementação, sugerindo o papel da adição deste material no enriquecimento da diversidade microbiana.

Kielak e colaboradores (2013) também avaliaram o impacto do enriquecimento de solo com quitina (resíduos de camarão) na abundância e diversidade da comunidade bacteriana. Os autores realizaram monitoramento da diversidade (PCR) após 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de incubação, verificando forte influencia da quitina na modificação da comunidade bacteriana.

Quando quitina é adicionada ao solo, actinomicetos respondem com um crescimento rápido (MANUCHAROVA et al., 2008) parecendo estimular principalmente *Streptomyces* (Gomes et al. 2000). Gomes e colaboradores (2000) realizaram o isolamento de actinomicetos de solo sob condição de enriquecimento seletivo com quitina a 4%, por um período de 30 dias. Os autores obtiveram um total de quarenta e um isolados, sendo que todos eles foram capazes de produzir zonas claras em meio sólido seletivo contendo quitina coloidal.

Manucharova e colaboradores (2005) investigaram a dinâmica populacional microbiana em solo na presença e ausência de quitina, revelando em todas as fases da investigação, um maior número de micro-organismos quitinolíticos nos tratamentos com quitina, em comparação aos controles.

Em estudo realizado por De Boer e colaboradores (1999) a adição de quitina ao solo pareceu estimular de forma geral a microbiota, mas principalmente os organismos quitinolíticos. Fabry (2007) cita o papel de materiais ricos em quitina particularmente na estimulação da comunidade bacteriana quitinolítica.

De acordo com Sato e colaboradores (2010) até o momento, um grande número de bactérias quitinolíticas foram isoladas de solos, entretanto há diversas que ainda não foram identificadas.

6 CONCLUSÃO

- Os substratos indutores selecionados possibilitaram o enriquecimento seletivo da microbiota dos solos em estudo, favorecendo o isolamento dos grupos bacterianos de interesse.
- O parâmetro monitoramento enzimático demonstrou-se eficiente na avaliação dos efeitos dos substratos indutores bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja na atividade celulolítica e proteolítica, respectivamente, de ambos os solos em estudo, permitindo a identificação de tempos de incubação favoráveis a obtenção dos grupos bacterianos de interesse.
- O parâmetro monitoramento enzimático demonstrou-se eficiente também na avaliação dos efeitos do substrato indutor farelo de crisalida na atividade quitinolítica de solo agrícola, entretanto não possibilitou o mesmo em solo sob pousio.
- O solo agrícola em estudo se mostrou a principal fonte de micro-organismos produtores de celulase, sendo obtido um total de 80 isolados bacterianos celulolíticos a partir dos microcosmos de enriquecimento seletivo deste solo na presença do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar.
- O solo sob pousio em estudo se mostrou a principal fonte de micro-organismos produtores de protease, sendo obtido um total de 132 isolados bacterianos proteolíticos a partir dos microcosmos de enriquecimento seletivo deste solo na presença do substrato indutor farelo de soja.
- Todos os isolados bacterianos obtidos nos microcosmos de enriquecimento seletivo incubados a 58°C podem ser considerados candidatos a termoestabilidade, característica essa, favorável a aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v.74, p. 35-47, 2000.

ALEF, K.; NANIPIERI, P. (1995a). Celulase Activity. In: ALEF, K. & NANIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. New York: Acad.Press, 1995, cap. 7, p.347-349.

ALEF, K.; NANIPIERI, P. (1995b). Protease Activity. In: ALEF, K. & NANIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. New York: Acad.Press, 1995, cap. 7, p.313-315.

ALEF, K.; NANIPIERI, P. (1995c). Chitinase Activity. In: ALEF, K. & NANIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. New York: Acad.Press, 1995, cap. 7, p.360-361.

ALLISON, S.; VITOUSEK, P.M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p.937-944, 2005.

ALLISON, S.D.; GARTNER, T.; HOLLAND, K.; WEINTRAUB, M.; SINSAB-AUGH, R.L. (2007). Soil enzymes: linking proteomics and eco-logical process. In: **Manual of Environmental Microbiology**. ASM Press, 3rd Edition, Washington D. C., pp. 704–711.

ALOTAIBI, K, D.; SCHOENAU, J.J. Enzymatic activity and microbial biomass in soil amended with biofuel production byproducts. **Applied Soil Ecology**, v.48, p. 227–235, 2011.

BABUJIA, L. C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BROOKES, P. C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 2174-2181, 2010.

BALDRIAN, P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. **Plant Soil Environment**, v.55, n. 9, p.370–378, 2009.

BALDRIAN, P. ; SNAJDR, J.; MERHAUTOVÁ, V.; DOBIÁSOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; VALASKOVA, V. Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. **Soil Biology & Biochemistry**, p.1-9, 2012.

BAKSHI, M.; VARMA, A. Soil Enzyme: The State-of-Art. In: SHUKLA, G; VARMA, A. **Soil Enzymology**: Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, v.22, p.1-23.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant *par excellence* and/or a reclaimable natural resource?. **Biodegradation**, v.3, p.171-188, 1992.

BAYER, E. A.; CHANZY, H.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 548-557, 1998.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 677-683, 2004.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 355–383, 2000.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of a oxidation stable, thiol dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 294-304, 2003.

BÉLAIR, G.; TREMBLAY, N. The influence of chitin-urea amendments applied to an organic soil on a Meloidogyne hapla population and on the growth of greenhouse tomato. **Phytoprotection**, v. 76, n. 2, p. 75-80, 1995.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes – present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.

BRZOSTEK, E. R.; FINZI, A. C. Substrate supply, fine roots, and temperature control proteolytic enzyme activity in temperate forest soils, **Ecology**, v. 92, n.4, p. 892–902, 2011.

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.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J.L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.58, p. 216-234, 2013.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637-644, 2005.

CAYUELA, M. L.; SINICCO, T.; MONDINI, C. Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residues in soil. **Applied Soil Ecology**, v.41, p. 118 – 127, 2009.

CENCIANI, K.; FREITAS, S.S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Microbial Enzymatic Activity and Thermal Effect in a Tropical Soil Treated With Organic Materials. **Science Agricola**, v.65, n.6, p.674-680, 2008.

CENCIANI, K.; FREITAS, S.; AUXILIADORA, S.; CRITTER, M.; AIROLDI, C. Enzymatic activity measured by microcalorimetry in soil amended with organic residues. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.35, p. 1167-1175, 2011.

CHANG, E-H.; CHUNG, R-S.; TSAI, Y-H. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.53, p. 132-140, 2007.

CHEN, J.; WANG, Q.; HUA, Z.; DU, G. Research and application of biotechnology in textile industries in China. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1651-1655, 2007.

CHENG, A.; LU, T. K. Synthetic biology: an emerging engineering discipline. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 155-178, 2012.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.

CORDEIRO, M. A. S.; CORÁ, J.E.; NAHAS, E. Atributos Bioquímicos e Químicos do Solo Rizosférico e Não Rizosférico de Culturas em Rotação no Sistema De Semeadura Direta, **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 36, p. 1794 - 1803, 2012.

CORREIA, V. A. B. **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA LIPASE DO METAGENOMA DE SOLO DO CERRADO**. 2010. 49 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbial Biotechnology**, v.71, p.773-782, 2006.

DE AZEREDO, L.A.I.; FREIRE, D.M.G.; SOARES, R.M.A.; LEITE, S.G.F.; COELHO, R.R.R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 354–358, 2004.

DE BOER, W.; GERARDS, S.; GUNNEWIEK, R. M. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 170-177, 1999.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Cellulase Activity of Soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, n.10, p.1347-1354, 1994.

DE PARIS, L.D. **PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DAS SOJAS ORGÂNICA, TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL**. 2008. 115f. Dissertação (Pós- Graduação em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**, v.7, p.641-646, 2004.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DESWAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 373-385, 2005.

DOYLE, J.; PAVEL, R.; BARNES, G. STEINBERGER, Y. Cellulase dynamics in a desert soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 371-376, 2006.

DUARTE, M.W.; DAMASCENO, R.G.; SALAMONI, S.P.; DE OLIVEIRA, M.F.; VANDER SAND, S.T. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. 2009. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

DUBEY, S.K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2217–2224, 2006.

FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Antagonismo de Rizobactérias a *Meloidogyne javanica* em Dois Tipos de Solo e seus Efeitos sobre a Eclosão, **Nematologia Brasileira**, v.31, n. 3, p. 222-228, 2007.

FACCI, L. D. **Variáveis Microbiológicas como Indicadoras da Qualidade do Solo sob Diferentes Usos**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais), IAC- Instituto Agronômico, Campinas, 2008.

FELSE, P.A.; PANDA, T. Production of microbial chitinases- A revisit. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 127-134, 2000.

FERNANDES, S. A. P.; BETTIOL, W.; CERRI, C.C. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. **Applied Soil Ecology**, v.30, p.65–77, 2005.

FREIRE, F. M.; PITTA, G.V.E.; ALVES, V.M.C.; DE FRANÇA, G.E.; COELHO, A.M. **Fertilidade de Solos: Interpretação de Resultados de Análise do Solo**. Embrapa- ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - 2ª Edição, 2006.

FUKA, M. M.; ENGEL, M.; HAGN, A.; MUNCH, J. C.; SOMMER, M.; SCHLOTTER, M. Changes of Diversity Pattern of Proteolytic Bacteria over Time and Space in an Agricultural Soil. **Microbial Ecology**, v. 57, p.391–401, 2009.

FURTADO, M. A. M.; GOMES, J. C.; SILVA, C. A. S. S.; ORNELLAS, C. B. D.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína Láctea co-precipitada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 625-639, 2001.

GEISSELER, D.; HORWATH, W.R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 3040–3048, 2008.

GEISSELER, D.; HORWATH, W.R. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. **Pedobiologia**, v.53, p. 87-98, 2009.

GIANFREDA, L; RUGGIERO, P. 2006. Enzyme activities in soil. In: NANNIPIERI, P. & SMALLA, K. **Nucleic acids and proteins in soil**. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, p. 257-311.

GOODAY, G.W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation**, v. 1, p. 177-190, 1990.

GOMES, R.C.; SEMÊDO, L.T.A.S.; LINHARES, A. A.; GUIMARÃES, A.C.C.; ALVIANO, C.S.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. Efficiency of the dispersion and differential centrifugation technique in the isolation of chitinolytic actinomycetes from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.47-50, 1999.

GONÇALVES, I. C. R. **ATRIBUTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO SOLO E PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-CAUPI APÓS DOIS ANOS DE APLICAÇÃO DE LODO DE CURTUME COMPOSTADO**. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), UFPI- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

GONZALEZ, A.; KING, A.; ROBESON II, M. S.; SONG, S.; Shade, A.; Metcalf, J. L.; Knight, R. Characterizing microbial communities through space and time, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p.431-436, 2012.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GRÉGGIO, T. C.; NAHAS, E. Atividade enzimática do solo sob dois fragmentos florestais. **Científica**, v. 35, n.2, p. 179-187, 2007.

GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 112-129, 2013.

GUERARD, GUIMAS, BINET. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 19–20 , p. 489–498, 2002.

GUO, S-H.; CHEN, J-K.; LEE, W-C. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 550–556, 2004.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.15-32, 2002.

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

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p. 551-560, 1999.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect CM cellulase activity of microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p.109-115, 1977.

HERNÁNDEZ, D. L.; HOBBIE, S.E. The effects of substrate composition, quantity, and diversity on microbial activity. **Plant Soil**, v. 335, n.1, p. 397-411, 2010.

HOPE, C.F.A. & BURNS, R.G. Activity, origins and location of cellulase in a silt loam soil. **Biol. Fert. Soils**, v.5, p.164-170,1987.

HSU, S. C.; LOCKWOOD, J. L. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 422-426, 1975.

HUANG, J-H.; CHEN, C-J.; SU, Y-C. Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 89-95, 1996.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-285, 1998.

IYYEMPERUMAL, K.; SHI, W. Soil enzyme activities in two forage systems following application of different rates of swine lagoon effluent or ammonium nitrate. **Applied Soil Ecology**, v. 38, p.128 – 136, 2008.

ITANO, F. H. **Otimização da produção de quitinase de Bacillus spp.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), UEL-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

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

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaloophilic *Bacillus clausii* I- 52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry detergent additive, **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.176-183, 2005.

JÚNIOR, M. M.; MELO, W.J. Carbono, Carbono da Biomassa Microbiana e Atividade Enzimática em um Solo sob Mata Natural, Pastagem e Cultura do Algodoeiro. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 23, p.257-263, 1999.

KHALILI, B.; NOURBAKHSH, F.; NILI, N., KHADEMI, H., SHARIFNABI, B. Diversity of soil cellulase isoenzymes is associated with soil cellulose kinetic and thermodynamic parameters. **Soil Biology & Biochemistry**, v.43, p.1639-1648, 2011.

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

KIELAK, A. M.; CRETOIU, M. S.; SEMENOV, A. V.; SØRENSEN, S. J., ELSAS, J. D. V. Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.1, p.263-272, 2013.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Isolation and characterization of a protease form *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 280-288, 2000.

KUJUR, M.; GARTIA, S.K.; PATEL, A.K. QUANTIFYING THE CONTRIBUTION OF DIFFERENT SOIL PROPERTIES ON ENZYME ACTIVITIES IN DRY TROPICAL ECOSYSTEMS. **ARNP Journal of Agricultural and Biological Science (ISSN 1990-6145)**, v.7, n.9, 2012.

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

LADD J.N. & BUTLER, J.H.A. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. **Soil Biology & Biochemistry.**, v.4, p.19-30, 1972.

LORENTZ, R. H. **SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus* spp COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA.** 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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.

MACEDO, A.J.; DE SILVA, W.O.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.; TERMIGNONI, C. Nível keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p.594-596, 2005.

MAKI, M.; LEUG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 5, p. 500-516, 2009.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem, **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 181-191, 2008.

MANUCHAROVA, N. A.; VLASENKO, A. N.; ZENOVA, G.M.; DOBROVOL'SKAYA, T. G.; STEPANOV, A. L. Methodological Aspects of Assessing Chitin Utilization by Soil Microorganisms. **BIOLOGY BULLETIN**, v. 35, n.5, p.549–553, 2008.

MANUCHAROVA, N. A.; BELOVA, E.V.; VOROB'EV, A. V.; POLYANSKAYA, L. M.; STEPANOV, A. L. Succession of Chitinolytic Microorganisms in Chernozem Soil. **Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 602–607, 2005.

MARON, P-A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 403-411, 2011.

MARX, M. C.; KANDELER, E.; WOOD, M.; WERMBTER, N.; JARVIS, S.C. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p.35–48, 2005.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Como Isolar micro-organismos degradadores de moléculas xenobióticas**. Microbiologia Ambiental, 2ª ed, p. 168-183, 2008.

MONDINI, C.; SINICCO, T.; CAYUELA, M. L. **Mineralization dynamics and biochemical properties following application of organic residues to soil**. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, p.156-159, 2010.

MIAN, I.H.; GODOY, G.; SHELBY, R. A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Chitin Amendments for Control of Meloidogyne Arenaria in Infested Soil. **Nematropica**, v.12, n.1, p.71-84, 1982.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.. Enzimas: Poderosas Ferramentas na Indústria. **CIÊNCIA HOJE**, v. 41, n. 242, p.28-33, 2007.

NACKE, H.; ENGELHAUPT, M.; BRADY, S.; FISCHER, C.; TAUTZT, J.; DANIEL, R. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 663–675, 2012.

NAHER, V. A.; RADZIAH, O.; SHAMSUDDIN, Z. M.; HALIMI, M. S.; RAZI, M. I. Isolation of diazotrophs from different soils of Tanjong Karang rice growing area in Malaysia. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, p. 547-552, 2009.

NAKAGAWA, L.E.; ANDRÉA, M. Efeitos e Alterações nas Características do Solo sobre a degradação de Hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 30, p. 575-582, 2006.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions, **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; REDDY, G.; REDDY, B. Effects of cotton ginning mill effluents on soil enzymatic activities and nitrogen mineralization in soil. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n.1, p.128-137, 2011.

NASCIMENTO, W.C.; MARTINS, M.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.91-96, 2004.

NIELSEN, M.N.; WINDING, A. **Microorganisms as Indicators of Soil Health**. Denmark, National Environmental Research Institute, 2002. 84p. (Technical Report, 388).

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, p. 367–375, 2003.

PASCUAL, J.A., GARCIA, C., HERNANDEZ, T., AYUSO, M. Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 429–434, 1998.

PATIL, R. S., GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 473–483, 2000.

PAVAN, M.A.; MIYAZAWA, M. **Análises químicas de solo: Parâmetros para Interpretação**. Londrina, IAPAR-Instituto Agronômico do Paraná, 1996. 48p. (IAPAR. Circular, 91).

PAVEL, R.; DOYLE, J.; STEINBERGER, Y. Seasonal patterns of cellulase concentration in desert soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p.549-554, 2004.

PELACH, M.A.; PASTOR, F.J.; PUIG, J.; VILASECA, F.; MUTJE, P. Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1063-1067, 2003.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C. P.; GAVA, C. A. T. Efeito do Cultivo da Soja na Dinâmica da População Bacteriana em Solos de Cerrado. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.35, n.6, p.1183-1190, 2000.

PRADEEP, M.R.; NARASIMHA, G. Effect of leather industry effluents on soil microbial and protease activity. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p.39-42, 2012.

RAO, M.B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

RASTOGI, G. MUPPIDI, G.L.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; APEL, W. A.; BANG, S. S.; DIXON, D. J.; SANI, R. K. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 585–598, 2009.

RATH, M.; MISHRA, C.S.K.; MOHANTY, R.C. Microbial Population and Some Soil Enzyme Activities in Iron and Chromite Mine Spoil. **International Journal of Ecology and Environmental Sciences**, v. 36, n. 2-3, p.187-193, 2010.

RAY, ABHIJIT. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **Int. J. Tech**, v.2, p.1-4, 2012.

RESAT, H.; BAILEY, V.; MCCUE, L. A.; KONOPKA, A. Modelling microbia dynamics in heterogeneous environments: growth on soil carbon sources. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 883-897, 2012.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; GODOY, G.; MORGAN-JONES, G.; SHELBY, R.A. The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies. **Plant and Soil**, v.75, p. 95-106, 1983.

ROS, M.; HERNANDEZ, M.T.; GARCÍA, C. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 463–469, 2003.

ROS, M.; PASCUAL, J.A.; GARCÍA, C.; HERNANDEZ, M.T.; INSAM,H. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p. 3443–3452, 2006.

ROSA, M. M. **Avaliação de Diferentes Metodologias para extração de DNA de Solo sob Cultivo de Cana-de-Açúcar**. 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada), UNESP-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

SAJJAD, M.H.; LODHI, A. AZAM, F. Changes in Enzyme Activity During the Decomposition of Plant Residues in Soil. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.9, p. 952-955, 2002.

SALLES, H. O. ; GOMES, G.M.F.; ANDRADE, L.B.D.S.; DE ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R.; EGITO, A.S. **Metodologia Científica: Ensaio Altersob Pousio para Triagem de Extratos Proteicos com Atividade Celulolítica**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010. 4p. (Embrapa Caprinos e Ovinos Comunicado Técnico Online, 112). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31686/1/UMT-Cot112.pdf>

SARDANS, J.; PEÑUELAS, J.; ESTIARTE, M. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.223-235, 2008.

SATO, K. AZAMA, Y.; NOGAWA, M.; TAGUCHI, G.; SHIMOSAKA, M. Analysis of a change in bacterial community in different environments with addition of chitin or chitosan. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 472-478, 2010.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality, **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 98, p. 255–262, 2003.

SEVERINO, L. S.; COSTA, F. X.; BELTRÃO, N.E.D.M.; LUCENA, M. A.; GUIMARÃES, M.M.B. Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.1, 2004.

SHACKLE, V.J.; FREEMAN, C.; REYNOLDS, B. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1935–1940, 2000.

SHAHIDI, F. ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p.37-51, 1999.

SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R. M.; GUPTA, L. K.; GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075 –1084, 2002.

SHI, W. 2011. Enzymes: Soil Carbon Sequestration and Nutrient Cycling. In: SHUKLA, G.; VARMA, A. **Soil Enzymology: Soil Biology**. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, v.22, p. 43-60.

SILVA, E.T.; MELO, W.J.D.; TEIXEIRA, S.T.; CHELI, R. A.; LEITE, S. A. S. **Soil protease activity and nitrogen availability to sorghum**. In: CONGRES MONDIAL DE SCIENCE DU SOL, 12., 1998, Montpellier, França, p.1-6.

SILVA, E. T.; MELO, W.J. Atividade de Protease e Disponibilidade de Nitrogênio para Laranja Cultivada em Latossolo Vermelho Distrófico. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 28, p. 833-841, 2004.

SINEGANI, A.A.S.; MAHOHI, A. Soil water potential effects on the cellulase activities of soil treated with sewage sludge. **Plant Soil Environment**, v. 56, n. 7, p. 333–339, 2010.

STARK, C. H.; CONDRON, L. M.; O'CALLAGHAN, M.; STEWART, A.; DI, H. J. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p.1352–1363, 2008.

SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases :Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

TANG, X.Y.; PAN, Y.; LI, S.; HE, B.F. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7388–7392, 2008.

TEJADA, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 1010–1017, 2006.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240–245, 2002.

TRASAR-CEPEDA, C.; GIL-SOTRES, F.; LEIRÓS, M. C. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p. 311–319, 2007.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; GIL-SOTRES, F. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2146–2155, 2008.

UENO, H.; MIYASHITA, K. Inductive production of chitinolytic enzymes in soil microcosms using chitin, other carbon-sources, and chitinase-producing *Streptomyces*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.46, n. 4, p. 863-871, 2000.

ULRICH, A.; KLIMKE, G.; WIRTH, S. Diversity and Activity of Cellulose-Decomposing Bacteria, Isolated from a Sandy and a Loamy Soil after Long-Term Manure Application. **Microbial Ecology**, v.55, p.512–522, 2008.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, p.1893-1898, 2004.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N-mineral de um solo Podzólico Vermelho - Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.35-42, 2000.

WALDROP, M.P.; BALSER, T.C.; FIRESTONE, M.K. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1837–1846, 2000.

WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2098–2106, 2008.

WANG, S-L., SHIH, I-L.; LIANG, T-W.; WANG, C-H. Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 2241-2248, 2002.

WANG, S-L.; LIANG, T-W.; YEN, Y-H. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p.732-742, 2011.

WATANABE, K.; ASAKAWA, S.; HAYANO, K. Evaluation of Extracellular Protease of Soil Bacteria. **Soil Biology Biochemistry**, v. 26, n.4, p. 419-482, 1994.

WONGKAEW, P.; HOMKRATOKE, T. Enhancement of soil microbial metabolic activity in tomato field plots by chitin application. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, p.325-335, 2009.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M. C. P. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO SOLO. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- A fim de se confirmar também um possível papel dos SI no aumento da diversidade microbiana nos solos em estudo, os isolados bacterianos obtidos devem ser submetidos a técnicas de biologia molecular capazes de defender tal abordagem, uma vez que os resultados obtidos não são suficientes para defendê-la.

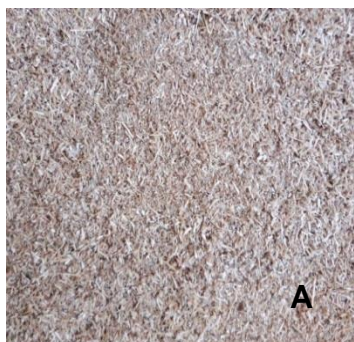
- Os isolados bacterianos que se apresentaram em teste qualitativo, como bons candidatos a produção enzimática, deverão ser submetidos a testes quantitativos para melhor avaliação da capacidade de produção das enzimas de interesse, e possivelmente à trabalhos de otimizações.

- Os isolados bacterianos obtidos a partir dos microcosmos incubados a 58°C deverão ter confirmada a capacidade de crescimento sob elevada temperatura, bem como a termoestabilidade das enzimas por eles produzidas.

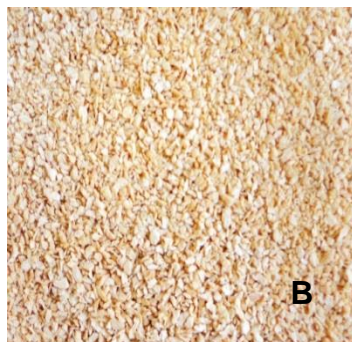
- Apesar das metodologias de monitoramento enzimático terem contribuído para a avaliação de efeitos da adição de SI aos solos e para a obtenção de períodos de incubação favoráveis ao isolamento dos grupos bacterianos de interesse, essas apresentam limitações. Portanto, devem ser melhor estudadas, e possivelmente otimizadas.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Substratos Indutores (SI).



Fonte: Da autora, 2013



Fonte: Da autora, 2013



Fonte: Da autora, 2013

A: Bagaço de Cana-de-Açúcar (BC)

B: Farelo de Soja (FS)

C: Farelo de Crisálida (FC)

Apêndice 2 – Representação da diversidade microbiana acessada ao longo da etapa de isolamento.



Fonte: Da autora, 2013

Apêndice 3 – Resultados gerais das etapas de isolamento e avaliação qualitativa para os microcosmos montados a partir de solo agrícola e sob pousio na ausência e presença do substrato indutor bagaço de cana-de-açúcar.

Solo	T ¹	Condição ²	Replicata	Número Isolados	Total ³ Isolados	Número Produtores ⁴	Total ³ Produtores	Produtores (%) ⁵
Agrícola	28°C	C / BC	1	23	103	13	60	58,25
			2	26		14		
			3	30		18		
			4	24		15		
		S / BC	1	8	21	5	10	47,62
			2	4		3		
			3	3		N/D		
			4	6		2		
	58°C	C / BC	1	8	49	3	20	40,82
			2	18		8		
			3	13		5		
			4	10		4		
S / BC		1	4	8	1	1	12,50	
		2	A/I		N/A			
		3	1		N/D			
		4	3		N/D			
Sob Pousio	28°C	C / BC	1	26	78	17	51	65,38
			2	15		9		
			3	20		13		
			4	17		12		
		S / BC	1	5	36	N/D	8	22,22
			2	10		4		
			3	8		1		
			4	13		3		
	58°C	C / BC	1	7	30	5	15	50,00
			2	10		6		
			3	5		N/D		
			4	8		4		
S / BC		1	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A	
		2	A/I		N/A			
		3	A/I		N/A			
		4	A/I		N/A			

¹ Temperatura de Incubação do Microcosmo. ² Presença de Substrato Indutor Bagaço de Cana-de-Açúcar (C/BC) ou Ausência de Substrato Indutor Bagaço de Cana-de-Açúcar (S/BC). ³ Conforme Avaliação Qualitativa. ⁴ Total por microcosmo (4 replicatas). ⁵ Obtido pela razão: Total Produtores/Total Isolados. A/I – Ausência de Isolados. N/D – Atividade Celulolítica não detectada. N/A – Não Aplicável

Apêndice 4 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



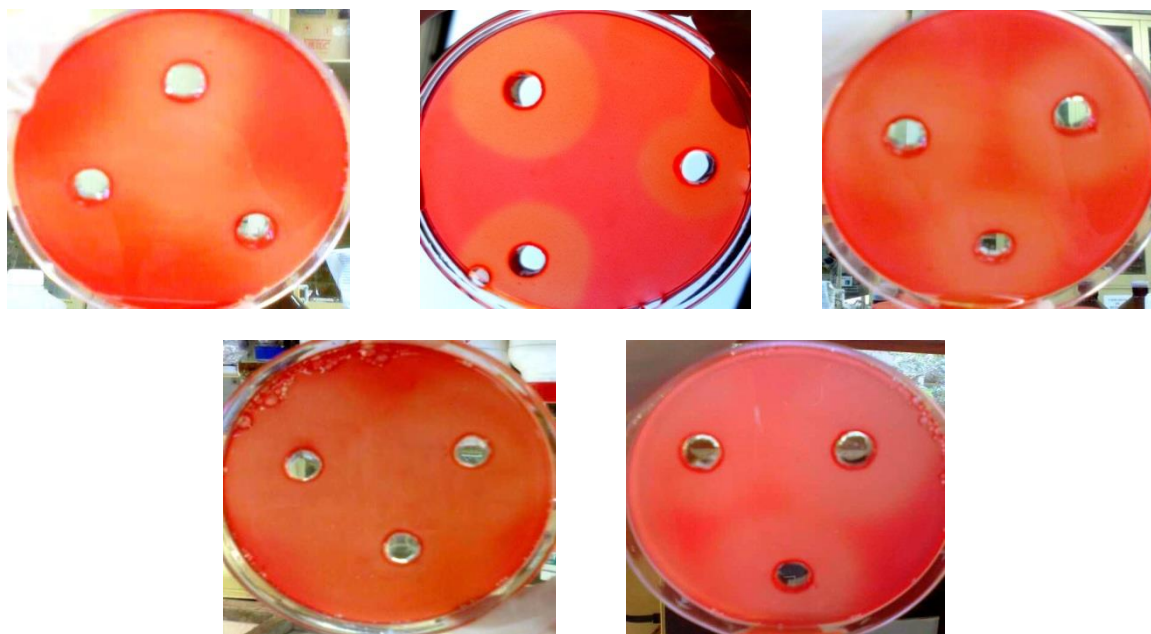
Apêndice 5 – Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



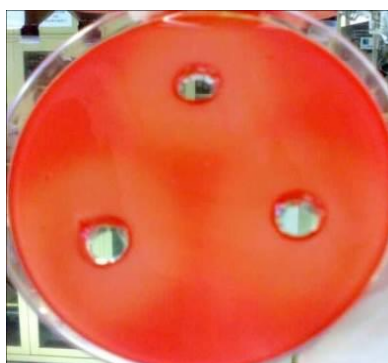
Apêndice 6 – Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo agrícola na ausência do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



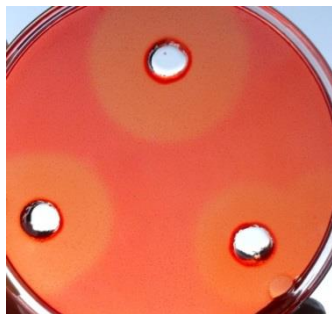
Apêndice 7 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



Apêndice 8 – Isolado bacteriano obtido a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na ausência do SI BC sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacou quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



Apêndice 9 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI BC sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram quanto à produção da enzima celulase em avaliação qualitativa.



Apêndice 10 – Resultados gerais das etapas de isolamento e avaliação qualitativa para os microcosmos montados a partir de solo agrícola e sob pousio na ausência e presença do substrato indutor farelo de soja.

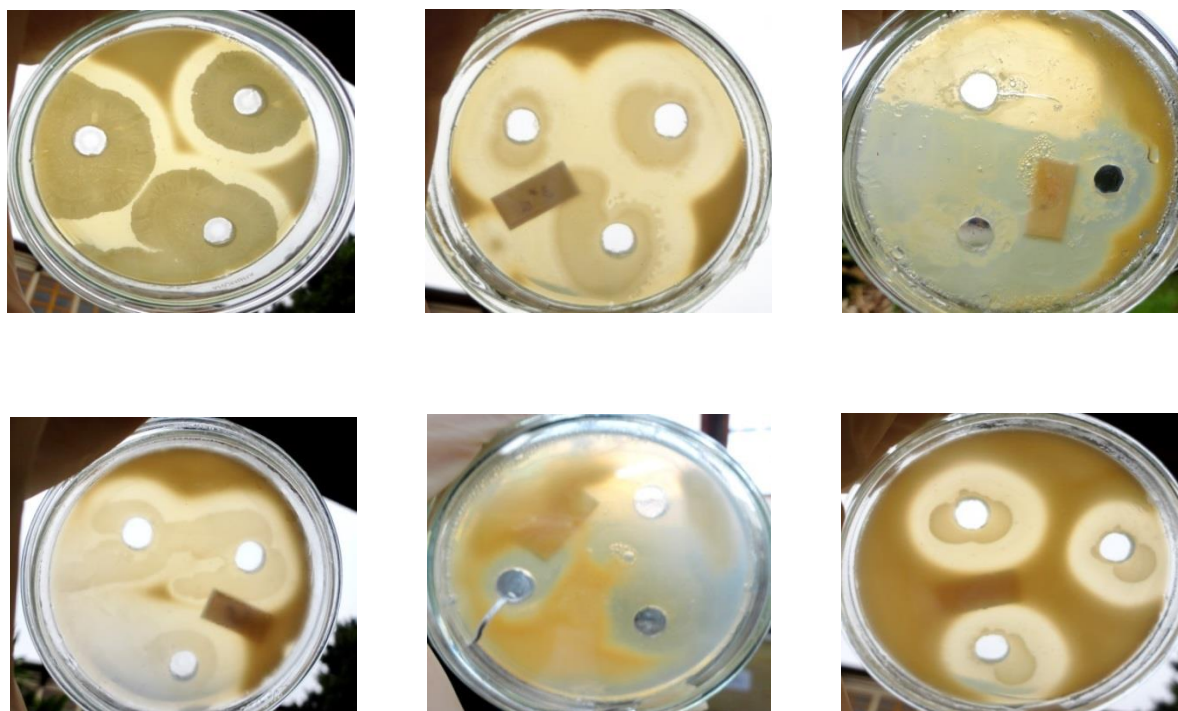
Solo	T ¹	Condição ²	Replicata	Número Isolados	Total ³ Isolados	Número Produtores ⁴	Total ³ Produtores	Produtores (%) ⁵
Agrícola	28°C	C / FS	1	31	120	18	72	60,00
			2	35		21		
			3	25		14		
			4	29		19		
		S / FS	1	6	2	25	7	28,00
			2	5	N/D			
			3	5	2			
			4	9	3			
	58°C	C / FS	1	9	28	7	23	82,14
			2	5		4		
			3	8		6		
			4	6		6		
S / FS		1	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A	
		2	A/I	N/A				
		3	A/I	N/A				
		4	A/I	N/A				
Sob Pousio	28°C	C / FS	1	35	152	22	115	75,66
			2	43		36		
			3	34		30		
			4	40		27		
		S / FS	1	5	N/D	20	10	50,00
			2	A/I	N/A			
			3	7	4			
			4	8	6			
	58°C	C / FS	1	8	26	7	17	65,38
			2	7		6		
			3	7		4		
			4	4		N/D		
S / FS		1	A/I	N/A	3	N/A	N/A	
		2	1	N/D				
		3	2	N/D				
		4	A/I	N/A				

¹ Temperatura de Incubação do Microcosmo. ² Presença de Substrato Indutor Farelo de Soja (C/FS) ou Ausência de Substrato Indutor Farelo de Soja (S/FS). ³ Conforme Avaliação Qualitativa. ⁴ Total por microcosmo (4 replicatas). ⁵ Obtido pela razão: Total Produtores/Total Isolados. A/I – Ausência de Isolados. N/D – Atividade Proteolítica não detectada. N/A – Não Aplicável.

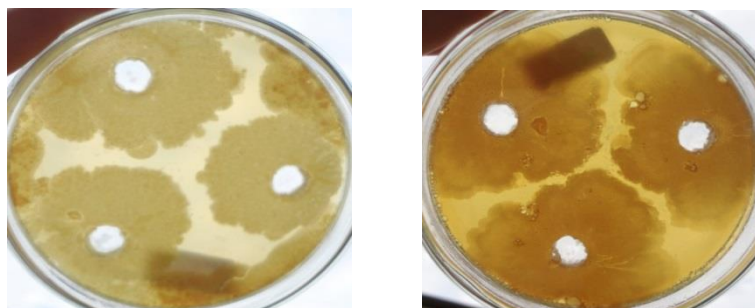
Apêndice 11 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



Apêndice 12 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



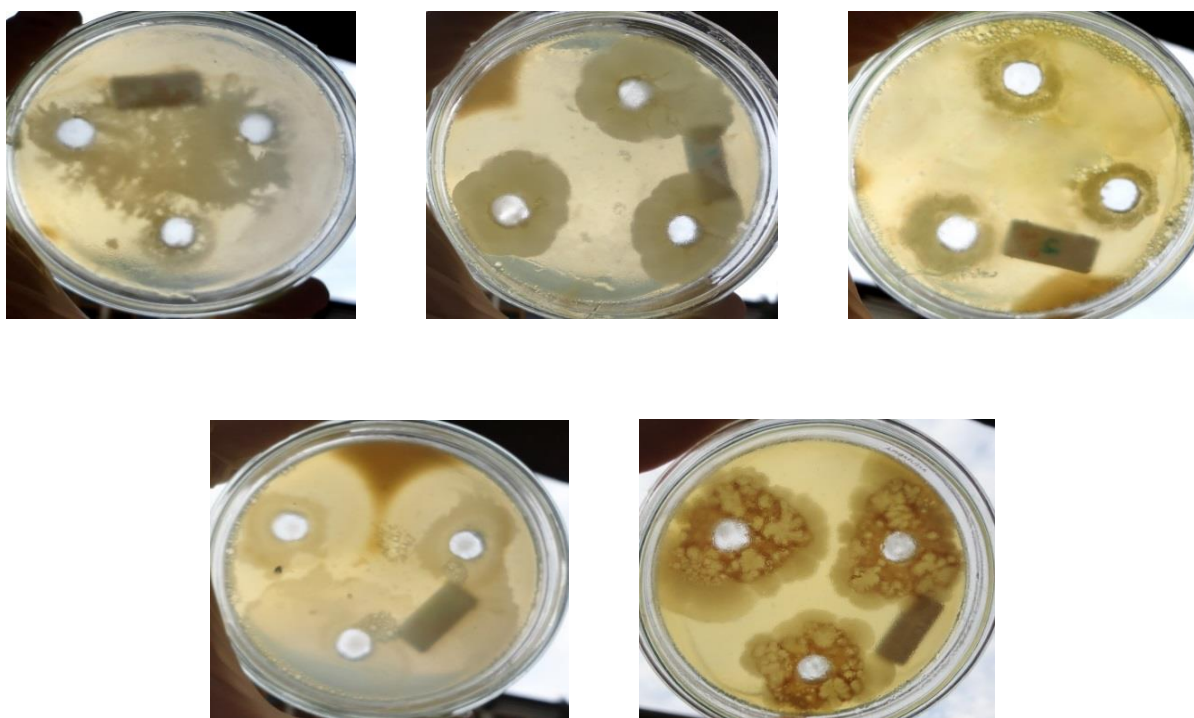
Apêndice 13 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo agrícola na ausência do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



Apêndice 14 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



Apêndice 15 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na presença do SI FS sob temperatura de incubação de 58°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



Apêndice 16 – Isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmo contendo solo sob pousio na ausência do SI FS sob temperatura de incubação de 28°C, que se destacaram quanto à produção da enzima protease em avaliação qualitativa.



Apêndice 17 – Resultados gerais das etapas de isolamento e avaliação qualitativa para os microcosmos montados a partir de solo agrícola e sob pousio na ausência e presença do substrato indutor farelo de crisálida.

Solo	T ¹	Condição ²	Replicata	Número Isolados	Total ³ Isolados	Número Produtores	Total ³ Produtores	Produtores (%)
Agrícola	28°C	C / FC	1	30	144	*	*	*
			2	37		*		
			3	45		*		
			4	32		*		
		S / FC	1	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A
			2	A/I		N/A		
			3	A/I		N/A		
			4	A/I		N/A		
	58°C	C / FC	1	A/I	20	*	*	*
			2	9		*		
			3	6		*		
			4	5		*		
		S / FC	1	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A
			2	A/I		N/A		
			3	A/I		N/A		
			4	A/I		N/A		
Sob Pousio	28°C	C / FC	1	31	121	*	*	*
			2	26		*		
			3	29		*		
			4	35		*		
		S / FC	1	5	23	*	*	*
			2	11		*		
			3	A/I		*		
			4	7		*		
	58°C	C / FC	1	10	42	*	*	*
			2	13		*		
			3	8		*		
			4	11		*		
		S / FC	1	A/I	N/A	N/A	N/A	N/A
			2	A/I		N/A		
			3	A/I		N/A		
			4	A/I		N/A		

¹ Temperatura de Incubação do Microcosmo. ² Presença de Substrato Indutor Farelo de Crisálida (C/FC) ou Ausência de Substrato Indutor Farelo de Crisálida (S/FC). ³ Total por microcosmo (4 replicatas). A/I – Ausência de Isolados. N/A – Não Aplicável. * Avaliação Qualitativa ainda não realizada.

ANEXOS

ANEXO A – Meios de Cultivo – Etapa de Isolamento

▪ Meio Dygs

Glicose	2,0 g
Peptona Bacteriológica	1,5 g
Extrato de Levedura	2,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
H_2O destilada q.s.p	1000 mL

O pH do meio foi ajustado à 6,8 e o meio sólido foi obtido com a adição de 15 gramas de Agar.

▪ Meio Mínimo

Glicose	2,0 g
NaNO_3	4,0 g
KH_2PO_4	1,5 g
FeCl_3	0,05 g
MgSO_4	0,2 g
CaCl_2	0,01 g
Na_2HPO_4	0,5 g
H_2O destilada q.s.p	1000 mL

O pH do meio foi ajustado à 7,0 e o meio sólido foi obtido com a adição de 15 gramas de Agar.

ANEXO B – Meios Sólidos – Etapa de Avaliação Qualitativa

- **Meio Ágar- Carboximetilcelulose (SALLES et al., 2010)**

Carboximetilcelulose	10,0 g
Tampão de Extração	1000 mL
Ágar	20,0 g

Tampão de Extração (Tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 6,9):

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,6 g
Na ₂ HPO ₄	2,3 g
Água Destilada q.s.p	1000 mL

- **Meio Ágar-Leite Desnatado (DUARTE et al., 2009)**

Solução 1:

Leite Desnatado	50,0 g
Água Destilada q.s.p	500 mL

Solução 2:

Ágar	15,0 g
Água Destilada q.s.p	500 mL

As Soluções 1 e 2 foram autoclavadas separadamente e misturadas somente no momento da utilização.

▪ **Meio Ágar-Quitina Coloidal (WANG et al., 2002)**

Quitina Coloidal	20,0 g
NaNO ₃	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 mL

Após mistura dos reagentes, o pH do meio foi ajustado à 7,0.

ANEXO C – Principais Soluções

▪ **Caseinato de Sódio (2%)**

Foram adicionados, sob agitação, 20,0 gramas de Caseinato de Sódio (Sigma Aldrich) em 600 mL de água destilada quente e após total solubilização o volume foi completado para 1000 mL.

▪ **Quitina Coloidal**

A quitina coloidal foi preparada de acordo com os procedimentos descritos por Itano (2006): 2,0 gramas de quitina cristalina (Chitin from crab shells, practical grade, Sigma Aldrich) foram misturados a 35 mL de HCl concentrado.

O precipitado formado foi lavado com água de torneira gelada até atingir pH aproximado de 6,0 centrifugando-se a 9000 rpm por 10 min e armazenado a 5 °C até a utilização.

▪ **Reagente Alcalino**

Para preparo de uma solução NaOH \ Na₂CO₃ foram dissolvidos 50,0 gramas de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) em aproximadamente 500 mL de água destilada com posterior adição de 60 mL de solução hidróxido de sódio a 1M. O volume foi completado para 1000 mL.

▪ **Reagente Fenol de Folin-Ciocalteu**

Foram diluídos 167 mL do reagente Folin-Ciocalteu para 500 mL de água destilada.

▪ **Solução DMBA**

Foram dissolvidos 10 gramas do reagente 4-(Dimetilamino)benzaldeído em uma mistura de 87,5 mL de Ácido Acético concentrado com 12,5 mL de Ácido Clorídrico concentrado. Nos momentos de uso, tal solução foi imediatamente diluída em proporção 1:4 com Ácido Acético concentrado.

- **Solução TCA 15%**

Dissolveu-se 150 gramas de Ácido Tricloroacético em 1000 mL de água destilada.

- **Solução Extratora**

Foi preparada uma solução KCL 2M, a partir da mistura de 149,12 g para 1000 mL de água destilada.

- **Tampão Acetato (0.1M, pH 5,5 contendo azida a 0,2%)**

Foram dissolvidos 13,6 gramas de Acetato de Sódio () em 700 mL de água destilada e o pH ajustado a 5,5 com solução diluída de ácido acético. Adicionou-se 2,0 gramas de azida de sódio NaN_3 e o volume foi completado para 1000 mL.

- **Tampão Borato (0.8M, pH 9,1)**

Foram dissolvidos 49,5 gramas de Ácido Bórico (H_3BO_3) em 400 mL de Solução KOH 0,8M. Adicionou-se 200 mL de água destilada, o pH foi ajustado a 9,1 e o volume completado para 1000 mL.

- **Tampão Fosfato (0,12M, pH 6,0 contendo azida a 0,2%)**

Foram dissolvidos 16,1 gramas de KH_2PO_4 e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 700 mL de água destilada e o pH ajustado a 6,0 com solução de hidróxido de sódio. Adicionou-se 2,0 gramas de NaN_3 e o volume foi completado para 1000 mL.

- **Tampão Tris (50 mM, pH 8,1)**

Dissolveu-se 6,05 gramas do reagente tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) em 700 mL de água destilada, o pH foi ajustado para 8,1 e o volume completado para 1000 mL.