

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS
DE INTERESSE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

Laís Postai Sacco
Tecnóloga em Biocombustíveis

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS
DE INTERESSE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

Laís Postai Sacco

**Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves
Co-orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2013

O48f Sacco, Laís Postai
Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos / Laís Postai Sacco. -- Jaboticabal, 2013 x, 57 p.47: il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Tiago Santana Balbuena, Mariana Carina Frigieri.
Bibliografia

1. Amilase. 2. Biotecnologia. 3. Celulase. 4. Gene 16S rRNA. 5. Lipase. 6. Protease. I. Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laís Postai Sacco nasceu aos 30 de outubro de 1988, na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em Janeiro de 2008 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, recebendo o título de tecnóloga em biocombustíveis em Dezembro de 2010. Em Agosto de 2011 ingressou no programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, em nível de Mestrado, pela FCAV/UNESP, obtendo o título em Julho de 2013.

Aos meus pais, José Roberto e Maria Lucia,
À minha irmã Heloísa.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À FCAV/UNESP pela oportunidade.

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves pela orientação, ensinamentos, paciência e oportunidade.

Ao Dr. João Carlos Campanharo pelos ensinamentos, paciência, sugestões, dedicação e ajuda nas práticas laboratoriais.

À profa. Dra. Eliana G. M. Lemos pela oportunidade.

À minha família pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu namorado Gustavo Costa pelo apoio, paciência e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	lii
ABSTRACT.....	lv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Interações entre micro-organismos.....	4
2.1.1 Celulase.....	5
2.1.2 Amilase.....	6
2.1.3 Lipase.....	7
2.1.4 Protease.....	8
2.1.5 Bactérias Solubilizadoras de Fosfato.....	9
2.2 Técnicas de estudo de microrganismos.....	11
2.2.1 Isolamento dos microrganismos.....	11
2.2.2 Emprego da isoenzima alfa esterase na diferenciação dos isolados.....	12
2.2.3 Utilização da região 16S rRNA na caracterização dos isolados.....	12
2.2.4 Avaliação das características morfológicas de bactérias.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção dos consórcios.....	14
3.2 Isolamento dos microrganismos.....	14
3.3 Avaliação do perfil eletroforético de alfa esterase.....	15
3.4 Extração de DNA.....	16
3.5 Eletroforese do DNA e quantificação.....	17
3.6 Amplificação do gene 16S rRNA.....	17
3.7 Eluição dos produtos de PCR.....	18
3.8 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	18
3.9 Avaliação da produção das enzimas.....	19

3.10 Avaliação das características morfológicas e alteração de pH.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
4.1 Isolamento do consórcio e avaliação isoenzimática.....	21
4.2 Avaliação das enzimas.....	23
4.3 Identificação dos micro-organismos.....	24
4.4 Caracterização morfológica.....	30
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICE.....	47

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS DE INTERESSE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

RESUMO - Os micro-organismos representam uma importante fonte de produtos naturais bioativos diversos. Esses organismos produzem enzimas que exercem papel importante em processos industriais com alto valor econômico agregado ou ambientalmente desejado. Apresentam uma série de vantagens em seu uso e produção. No presente trabalho foram utilizados consórcios degradadores de resíduos da biomassa lignocelulolítica, visando o isolamento e identificação de micro-organismos de interesse biotecnológico. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que apesar dos consórcios produzirem celulase, nenhum isolado produziu esse tipo de enzima. Foram isoladas bactérias produtoras de amilase, protease, lipase e solubilizam fosfato. Utilizando o sequenciamento do 16s rRNA foi identificado isolados pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Asticcacaulis*.

Palavras-chave: amilase, biotecnologia, celulase, gene 16S rRNA, lipase, protease

ISOLATION OF BACTERIAL THAT PRODUCES ENZYMES OF INTEREST IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESS

ABSTRACT – Microorganisms represent an important source of many bioactive natural products. These organisms produce enzymes that are important in industrial processes with high value aggregate economic or environmentally desired. The use of enzymes of microbial origin has been widely explored due to a series of industrial and environmental advantages. In this present work, a degrading consortium of lignocellulose biomass residues was used aiming the isolation and identification of the bacteria that produce enzymes with biotechnological interest. According to the observed results it can be said that although the consortia produces cellulose, isolated bacteria do not then produced no such enzyme. Bacteria isolated produced amylase, protease, lipase and phosphatase. With the sequencing of the 16S rRNA it was possible to determine that the isolates belong to the genus *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Asticcacaulis*.

Keywords: amylase, biotechnology, cellulase, gene 16S rRNA, lipase, protease

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB**- bactéria isolada que tem como fonte de carbono casca de amendoim e bagaço de cana-de-açúcar
- AS** - bactéria isolada do solo e tem como fonte de carbono casca de amendoim
- ATP** – trifosfato de adenosina
- Blast** – basic local alignment search tool
- BHB** – meio de cultivo Bushnell-Haas
- BOD** – demanda bioquímica de oxigênio
- CB**- bactéria isolada do bagaço de cana-de-açúcar, e tem como fonte de carbono carboximetilcelulose
- CMC** – carboximetilcelulose
- CS** – bactéria isolada do solo e tem como fonte de carbono carboximetilcelulose
- Gen Bank** – banco de genes
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- Dntp** – trifosfato de deoxirribonucleotídeo
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- IE** – índice de atividade enzimática
- Luz UV** – Luz Ultra Violeta
- MB** – bactéria isolada do bagaço de cana-de-açúcar e tem como fonte de carbono palha de milho
- MS** – bactéria isolado do solo e tem como fonte de carbono palha de milho
- mM** – milimolar
- NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
- NCBI** – national center for biotechnology information
- ng** – Nanograma, unidade de medida de massa ($1 \times 10^{-9} \text{g}$)
- P** – fósforo
- pb** – pares de base
- PEG** - meio de cultivo rico
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- p mol** – pico mol
- RDP** – ribossomal database Project
- rRNA** – ribossomal RNA
- RNase** – ribonuclease
- rpm** – Rotação por minuto
- SDS** – lauril sulfato de sódio
- Taq** – DNA polimerase termoestável
- TE** – solução tampão Tris-EDTA
- TEB** – solução tampão Tris-ácido bórico – EDTA
- Tris** – tris [hidroximetil] aminometano
- μL** – Microlitro, unidade de medida de volume ($1 \times 10^{-6} \text{L}$)
- YMA** – yeast malt agar
- V** – volt

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Composição do meio de cultivo PEG utilizado para o isolamento do consórcio.....	15
Tabela 2: Índice de atividade enzimática (IE) calculado após 5 dias de cultivo dos isolados em relação a produção de celulase, amilase, protease, lipase e de solubilizar fosfato.....	25
Tabela 3: Resultado da comparação das sequencias 16S rRNA com sequencias depositadas no Ribossomal Database Project (RDP) e nos bancos de dados SILVA e NCBI.....	28
Tabela 4: Avaliação morfológica dos isolados e avaliação quanto a produção de ácido/base.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Halo indicativo da produção de enzimas	22
Figura 2: Diferentes Perfis eletroforético de α -esterase dos isolados.....	22
Figura 3: Halo indicativo da produção de enzimas.....	24
Figura 4: Dendrograma do agrupamento hierárquico baseada na sequência parciais do gene 16S rRNA.....	29
Figura 5: Teste de produção ácido/base em meio YMA.....	32

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de enzimas era de U\$ 50 bilhões em 2009. Levando em consideração o aumento anual de consumo composto por uma taxa de 6% é esperado que esse mercado alcance U\$ 70 bilhões em 2015. As enzimas são utilizadas em muitos segmentos industriais como o de combustíveis, fármacos, cervejaria, alimentos, ração animal, detergente, papel, indústria têxtil, entre outros. O setor industrial está em constante pressão para usar mais processos que beneficiem o meio ambiente e para procurar novos métodos para tornar os produtos mais competitivos. Conseqüentemente, as enzimas microbianas estão ganhando mercado, substituindo a catálise química convencional em muitos processos industriais (VERMELHO *et al.*, 2013).

O Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza na indústria, embora apresente enorme potencial para produzi-las por possuir grande diversidade biológica, porém essa atividade ainda é pouco explorada. Esta diversidade pode resultar na obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial. Deve-se ressaltar que, no Brasil existe uma abundância de materiais orgânicos (resíduos agrícolas, como, a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros) que poderiam constituir substrato de baixo custo para estes micro-organismos (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

A introdução de enzimas como catalisadores em processos industriais mostra-se vantajosa, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, características desejáveis tanto pela indústria quanto para a integridade do meio ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; COSTA *et al.*, 2012). Desta forma, a utilização de enzimas nas indústrias é muito interessante, pois através delas pode-se melhorar a qualidade de um produto, tornar mais fácil a obtenção de compostos de interesse ou degradar substâncias indesejáveis, sendo todos os processos de modo específico (LIMA *et al.*, 2001).

As enzimas mais utilizadas tradicionalmente na indústria são as hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas ou amilolíticas (TAVARES *et al.*, 2012). Enzimas hidrolíticas dificilmente requerem algum cofator, e isso permite sua aplicação em grande

variedade de condições (QUAX, 2013), podendo ser utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (ITOH *et al.*, 1990).

Essas moléculas possuem uma ampla aplicação na indústria têxtil, são utilizadas durante o processamento das fibras têxteis, com a vantagem de redução do volume e conteúdo poluente dos efluentes formados e diminuição do consumo de energia (ANDREAUS *et al.*, 2008). No processamento de couros, as proteases são aplicadas na fase inicial de limpeza e remoção dos pelos enquanto que nas fases finais as proteases degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes. Já as celulases estão substituindo o uso de pedra polmes para dar a aparência envelhecida (*stonewashed*) aos *jeans* (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Proteases são utilizadas em todos os tipos de detergentes, sejam eles líquidos ou sabões em pó utilizados em máquinas automáticas de lavagem, e sua função é a degradação de compostos tipicamente proteínicos, como sangue, manchas de ovos e leite (MAURER, 2004).

Outro segmento industrial onde as enzimas são de grande importância é o da indústria alimentícia. Na panificação, o uso de enzimas é um processo necessário já que as farinhas utilizadas como matéria-prima possuem baixa atividade enzimática. O objetivo final da adição de amilases e proteases na massa do pão é facilitar sua manipulação nas máquinas (misturadores, laminadores, fornos). As amilases também são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de açúcar fermentescível na massa, melhorando o paladar e a qualidade da tostagem do pão (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Lipases e/ ou proteases também são utilizadas na produção de leites e derivados com a função de: modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite, desenvolver sabores característicos, alterar a gordura da manteiga utilizada no preparo de caramelos, requeijões e condimentos (molhos). Proteases têm sido empregadas, ainda, para reduzir o tempo global da cura do queijo, já que este tempo representa um alto percentual dos custos de produção (VITOLLO, 2001).

As lipases por sua vez têm além da aplicação como aditivos nos alimentos levando à modificação no sabor, podem ser usadas em processos de química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de água

residual (decomposição e remoção de substâncias oleosas), cosmética (remoção de lipídios), processamento do couro (remoção de lipídios) e ensaios biomédicos (triglicérides no sangue) (BURKERT *et al.*, 2004; ELIBOL; OZER, 2000; KAMINI *et al.*, 2000).

O Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas-LBMP, possui consórcios bacterianos degradadores de resíduo celulósico da biomassa, produzindo várias enzimas de interesse biotecnológico. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico a partir dos consórcios formados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interações entre micro-organismos

Na natureza várias espécies de micro-organismos convivem em comunidades interagindo uns com os outros. A convivência dessas espécies em conjunto normalmente permite que elas sejam mais eficientes (WACKETT, 2013). Estas interações como o consórcio de bactérias, podem ser de grande interesse industrial, catalisando ou degradando produtos, benéficos aos micro-organismos, que apresentam valor econômico agregado e, ao mesmo tempo, seja benéfico ao homem.

Consórcios podem executar funções complexas que populações individuais não podem além de serem mais robustos às flutuações ambientais. Esses aspectos interessantes são devido a duas características de organização. Em primeiro lugar, os membros comunicam-se uns com os outros, seja por metabólitos ou trocando sinais moleculares, cada um da população detecta e responde à presença de outros no consórcio. Esta comunicação permite a segunda característica importante, que é a divisão do trabalho. A produção total do consórcio consiste em uma combinação de tarefas realizadas por indivíduos constituintes ou subpopulações (BRENNER *et al.*, 2008).

Populações mistas podem desempenhar funções que são difíceis ou mesmo impossíveis para as estirpes ou espécies individuais. Equilibrando duas ou mais tarefas de modo que elas sejam concluídas com eficiência, enquanto para um único organismo não possa ser possível realizar situações complexas (ZALDIVAR *et al.*, 2001).

Um dos produtos estudados resultantes de interações bacterianas são a hidrólise de materiais lignocelulósicos, resultando em moléculas de glicose livre, utilizada para a produção de etanol. Segundo Haruta *et al.* (2002), um consórcio de bactérias celulolíticas juntamente com outras bactérias não celulolíticas, é ideal para a degradação da celulose. Atualmente, há vários estudos buscando encontrar consórcios bacterianos aptos a degradarem materiais lignocelulósicos, os quais se

apresentam na forma agrícola ou de resíduos de florestas e industriais, pois são produzidos em quantidades abundantes em todo o mundo (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.1.1. Celulase

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

O grande volume de resíduo celulósico gerado anualmente por causa da silvicultura, atividades agrícolas e industriais provoca desequilíbrio no ecossistema por ser de difícil degradação. A utilização da biomassa, que pode ser interessante devido ao baixo custo, é difícil por causa da dificuldade para ser quebrado em componentes utilizáveis (BHAT; BHAT, 1997). O tratamento de resíduos agrícolas tanto com enzimas celulolíticas ou micro-organismos podem levar a degradação deste material, promovendo o ciclo dos nutrientes no meio ambiente e reduzindo o impacto do acúmulo de resíduos nos diversos ecossistemas (DE VRIES; VISSER, 2001).

Segundo Alvira *et al.* (2010), para a utilização de carboidratos provenientes de materiais lignocelulósicos para a fermentação e produção de etanol, a matéria-prima deve passar por um pré tratamento e ser hidrolisada por enzimas para a liberação dos açúcares. Tal fato se deve a este material ser constituído, principalmente, de celulose (35-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (25-30%) (WONGWILAIWARIN *et al.* 2010), polímeros os quais dificultam a ação das enzimas.

Como já mencionado, a celulose é um homopolissacarídeo linear, composto por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (SANDGREN *et al.*,2005). A conformação β permite que a celulose forme cadeias retas bem longas. Várias cadeias retas dispostas paralelamente e interligadas por pontes de hidrogênio formam as micro fibrilas que são muito resistentes (DA-SILVA *et al.*,1997; STRYER, 1995). A degradação da celulose pode ser tanto por via ácida, como através da utilização de enzimas celulase, as quais são produzidas por

bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Porém poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (BHAT; BHAT, 1997). Devido a esta estrutura cristalina, há dificuldade na penetração tanto de enzimas como de moléculas pequenas como a água (LYND *et al.*, 2002).

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

2.1.2. Amilase

Outro carboidrato em evidencia para a produção de biocombustível é o amido, é o principal carboidrato sintetizado pelas plantas, depois da celulose. É um polímero de glicose de alta massa molar, acumulado na forma de reserva, sendo uma fonte de carbono e energia essencial para muitos organismos (VAN DER VEEN *et al.*, 2000). Este composto é constituído de duas frações moleculares: amilose e amilopectina. A amilose é originada por um polímero linear de duas unidades de glicose unidas entre si por ligações α -1,4. A amilopectina é a fração ramificada, constituída por cadeia de glicose com ligações α -1,4 e pontos de ramificações formadas por ligações α -1,6. O tamanho dos grânulos de amido e a proporção entre amilose e amilopectina contidas nos grânulos podem variar de acordo com a espécie vegetal e variedade botânica (LEONEL; CABELLO, 2001).

As amilases, 1,4 D glicanohidrolase, são enzimas industriais que quebram o amido ou o glicogênio em oligossacarídeos de tamanhos diferentes. Os membros da família da amilase são classificados de acordo com o tipo de hidrólise das moléculas

de amido. Alfa-amilase (EC 3.2.1.1), Beta-amilase (E.C 3.2.1.2), e Glicoamilase (E.C 3.2.1.3), têm sido amplamente utilizados em detergentes, alimentos, papel e industrial têxtil (GUPTA *et al.*, 2003; SUMAN *et al.*, 2009). A Alfa-amilase hidrolisa as ligações internas alfa -1,4 em amido de uma forma aleatória conduzindo a formação de maltodextrinas solúveis, maltose e glicose (GANGADHARAN *et al.*, 2009). Beta-amilase hidrolisa as ligações alfa-1,4-glicano em cadeias de amilosacarídeos, a partir das extremidades não redutoras e gera maltose (DABA *et al.*, 2012). Glicoamilase (1,4-alfa-D-glican-glicanohidrolase) hidrolisa ligações sucessivas na extremidade não redutora das moléculas de amido, liberando glicose (CANTAREL, 2009).

2.1.3. Lipase

Outra molécula de interesse industrial são os lipídios. Esterases (EC 3.1.1.1) e lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de cadeias curtas e longas de triacilgliceróis, respectivamente (Arpigny & Jaeger, 1999). As lipases catalisam várias reações, como hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis e reações de esterificação, transesterificação, inter esterificação de lipídios (COLLA *et al.*, 2010).

As lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos, a maioria das lipases utilizadas em finalidades biotecnológicas foram isoladas de fungos e bactérias (LIN *et al.*, 2006). As enzimas lipolíticas podem ser classificadas em três grupos principais com base na especificidade para o substrato: lipases (EC 3.1.1.3), esterases/carboxilesterases (EC 3.1.1.1) e fosfolipases (EC 3.1.4.11). Lipases catalisam a hidrólise de triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa (maior ou igual a 10 átomos de carbono). As lipases tem atividade na interface aquosa/não aquosa, cuja atividade é associada com mudanças do domínio da proteína (VERGER, 1997). As esterases preferem substratos solúveis em água e catalisam a hidrólise de ésteres de glicerol com cadeia acil curta (menor ou igual 10 átomos) em ácidos graxos (BORNSCHEUER, 2002). Por sua vez, as fosfolipases catalisam a hidrólise de vários tipos de fosfolipídios (JAEGER; EGGERT, 2002).

Deve-se ressaltar ainda que muitos micro-organismos secretam lipases durante o crescimento em resíduos orgânicos, tais como industriais e agropecuários (ALONSO *et al.*, 2005).

As enzimas lipolíticas estão atraindo grande atenção devido ao seu potencial biotecnológico (BENJAMIN; PANDEY, 1998). Aplicações biotecnológicas têm sido estabelecidas com sucesso usando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, para a produção de compostos farmacêuticos, agroquímicos e compostos aromáticos (JAEGER, 2002).

O biodiesel é formado pela reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal, que possuem em sua composição principalmente triacilgliceróis, também denominados triglicerídeos. Nessa reação, os triacilgliceróis reagem com o álcool na presença de um catalisador, formando aqui ésteres (biodiesel) e glicerol. A constituição do produto corresponde ao tipo de triacilglicerol utilizado na reação, mas os componentes mais comuns são ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) em diferentes proporções (ROTTIG *et al.*, 2010).

A aplicação de lipases para a produção de biodiesel, a partir de óleos vegetais brutos, possibilita produzir um produto de alta pureza, proveniente de gorduras descartadas, pois atuam sobre ácidos graxos tanto livres quanto ligados ao glicerol (PEREIRA *et al.*, 2012). Além disso, o uso de enzimas para a produção de biodiesel tem várias vantagens sobre os processos químicos, sendo realizado em condições de reação moderada, utiliza pouca quantidade de álcool, fácil recuperação do produto e o processo gera menor interferência ambiental (KOURIST, BRUNDIEK, BORNSCHEUER, 2010).

2.1.4. Protease

Outra enzima de interesse industrial é a protease, uma classe de enzimas que catalisam o desarranjo das proteínas pela hidrólise das ligações peptídicas. Proteases realizam diversas funções vitais, como a regulação do processamento de proteínas e dos níveis proteicos intracelulares e, remoção de proteínas anormais ou danificadas da célula. Elas estão envolvidas em vários papéis celulares como no

desenvolvimento, fisiologia, defesa e respostas ao stress. As enzimas proteolíticas são uma classe de catalisadores biológicos que atuam na clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, acelerando todas as reações químicas dentro das células (COOPER, 2000).

Essas enzimas são encontradas em uma ampla diversidade de organismos vivos, desde animais a micro-organismos, onde desempenham funções fisiológicas vitais, como na manutenção da homeostase e na participação em processos inflamatórios (RAO *et al.*, 2008). São comuns na natureza, mas os micro-organismos servem como fonte principal destas enzimas por causa do seu rápido crescimento, o espaço limitado requerido para o cultivo, e a facilidade com que eles podem ser manipulados geneticamente, para produzir novas enzimas com propriedades alteradas que são desejáveis para as suas várias aplicações (CHU, 2007).

As proteases são utilizadas no processamento do couro, são aplicadas na fase inicial de limpeza e remoção de pelos, na fase final as proteases degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes no couro (WISEMAN, 1985). Proteases são também amplamente usadas em áreas científicas, química e engenharia de proteínas, e em diferentes processos industriais, tais como a síntese de alimentos, indústria farmacêutica e indústria de detergente (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; KUMAR; TAKAGI, 1999).

2.1.5. Bactérias solubilizadoras de fosfato

Alguns micro-organismos possuem importância ambiental, como as bactérias solubilizadoras de fosfato. O fósforo é um elemento essencial encontrado em todos os seres vivos como parte de proteínas, ácidos nucleicos, membranas e moléculas de energia como ATP e NADPH. É o segundo elemento limitante do crescimento das plantas, precedido pelo Nitrogênio, mas dependendo dos fatores biológicos e ambientais pode ser o principal nutriente limitador do crescimento (HINSINGER, 2001). Esse elemento contribui para o processo metabólico de transferência de energia, biossíntese macromolecular, reações fotossíntese e respiração (SHENOY; KALAGUDI, 2005).

O fósforo é o nutriente de menor abundância e mobilidade no solo para as plantas (TAKAHASHI; ANWAR, 2007). Alguns solos têm níveis elevados de fosfato total, mesmo assim eles podem ser deficientes devido à baixa taxa de fosfato solúvel disponível (GYANESHWAR *et al.*, 2002), sendo necessário a utilização de fertilizantes a base deste elemento. Segundo ISHERWOOD, 2000 os recursos globais de fertilizantes fosfatados economicamente acessíveis vão se esgotar, resultando em aumento de custos dos fertilizantes fosfatados, bem como na sua escassez.

As plantas só conseguem utilizar pouca quantidade de fertilizantes fosfatados do que são frequentemente aplicados e o restante, que é cerca de 70%, é rapidamente convertido em complexos insolúveis tais como fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fosfato de ferro no solo (ALAM; LADHA, 2004; VASSILEV; VASSILEVA, 2003; TAO *et al.* 2008).

Os fertilizantes químicos têm impactos e custos crescentes. A utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato apresenta-se como uma possibilidade vantajosa e sustentável para práticas agrícolas (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Esses micro-organismos podem promover o crescimento da planta secretando hormônios de plantas como o ácido acético e citocinina (SELVARAJ *et al.*; 2008).

Como o fósforo é um nutriente mineral essencial que frequentemente limita o crescimento da planta, devido à sua baixa solubilidade e fixação no solo. A liberação da forma fixa e poucas formas solúveis são um aspecto importante para aumentar a fertilidade do solo. Esses micro-organismos causam a mobilização do fosfato insolúvel no solo e aumentam o crescimento da planta em solos com baixa disponibilidade de fósforo (TRIPURA *et al.*,2007).

A inoculação do solo com bactérias solubilizadoras de fosfato mostra melhor absorção do fósforo pelas plantas, devido à produção bacteriana de enzima extracelular e exsudação de ácidos orgânicos com possível estimulação do crescimento da planta (RODRIGUEZ *et al.*,2006). A associação entre essas bactérias e as raízes das plantas são o papel fundamental na nutrição do fosforo em solos agricultáveis, particularmente nos solos deficientes em fosforo (GOLDSTEIN, 2007; JORQUERA *et al.*, 2008).

As bactérias solubilizadoras de fosfato são um grupo diverso de bactérias independentes, capazes de solubilizar imediatamente o fósforo indisponível em fósforo solúvel (KHAN *et al.*, 2006). Esses micro-organismos fazem o papel principal no ciclo natural do fósforo. Esse ciclo acontece através da oxidação e redução de compostos fosfatados, aonde as reações entre a transferência de elétrons e a oxidação vão de fosfina (-3) para fosfato (-5) (OHTAKE, 1996). Essa transformação ocorre por acidificação, quelação, reações de troca e formação de substâncias poliméricas (DELVASTO *et al.*, 2006).

As bactérias solubilizadoras de fosfato formam um grupo diversificado de bactérias não relacionadas capazes de solubilizar prontamente formas fracamente solúvel de fósforo (KHAN *et al.*, 2006). Este grupo bacteriano é vital para o ciclo do fósforo no solo, e alguns deles podem ser utilizados a fim de aumentar a disponibilidade de fósforo no solo (KAMPFER, 2002). Essa habilidade de solubilizar fósforo possibilita o aumento do fósforo disponível para as plantas, auxiliando no papel fundamental no ciclo biogeoquímico do fósforo em ecossistemas naturais e agrícolas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; ZENG *et al.*, 2012).

2.2. Técnicas de estudo dos micro-organismos

2.2.1. Isolamento dos micro-organismos

A obtenção de culturas puras, que são adquiridas através do isolamento, é um dos primeiros procedimentos para que se possa realizar estudos sobre micro-organismos.

O desenvolvimento de meios de cultura sólidos permitiu o desenvolvimento de métodos mais eficientes para o isolamento de micro-organismos, chamados métodos de plaqueamento. O princípio geral desses métodos reside no fato de que uma célula viável, ao ser colocado em um meio adequado, cresce, originando uma colônia visível a olho nu. Essa colônia pode ser então, transferida para novo meio onde se multiplicará livre da presença de outros micro-organismos, obtendo-se, desta forma, uma cultura pura (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

Culturas puras de micro-organismos têm sido empregadas há mais de 100 anos em bioprocessos, e mesmo com o passar do tempo sua importância econômica continua a ser enorme. As reações catalisadas por micro-organismos possuem um elevado valor agregado na indústria química (€ 10 bilhões), sendo que nos próximos 10 anos estima-se que 60% do segmento da química fina sejam baseados nas conversões microbianas (LYND *et al.*, 2008).

2.2.2. Emprego da isoenzima alfa esterase na diferenciação dos isolados

A análise de isoenzimas evidencia a variação na sequência de aminoácidos da molécula proteica que tem a mesma função catalítica, detectando desta forma a variação na sequência de DNA que codifica a proteína (LIMA, 2000).

De maneira simplificada, as isoenzimas podem ser consideradas variações de uma dada enzima dentro de um organismo, que apresentam uma mesma especificidade de substrato. Assim sendo, a variação específica em número, composição e atividade das isoenzimas em cada sistema enzimático, permite a diferenciação entre variedades, sendo a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento (ALFENAS, 1998).

2.2.3. Utilização da região 16S rRNA na caracterização dos isolados

Em procariontes, o 16S rRNA ribossomal (rRNA) é um gene essencial, e ocorre pelo menos uma cópia por genoma (ACINAS *et al.*, 2004). A universalidade dos genes torna-os ideal para estudos filogenéticos e classificação taxonômica (WOESE, 1987). Os RNAs que compõem os ribossomos (rRNAs) estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas de vida (ATLAS, 1997). Este gene é composto por um conjunto de aproximadamente 1500 pares de nucleotídeos (WOESE, 1987) sendo dotadas de regiões altamente conservadas (WOESE, 1987). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a síntese de produtos de sequências das subunidades 5S, 16S e 23S do ribossomo o

que pode potencialmente diferenciar espécies e também mostrar diferenças intraespecífica (WAKABAYASHI; TRIYANTO; 1999; FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

2.2.4. Avaliação das características morfológicas de bactérias

A avaliação das características morfológicas é o primeiro passo para a identificação de um novo grupo taxonômico de micro-organismos. Essas características podem identificar diferenças fisiológicas importantes em micro-organismos, os quais podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (PELCZAR *et al.*, 1981).

Características culturais relevantes que podem ser avaliadas são o tempo de formação de colônias isoladas e alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como identificador de diferenças fisiológicas entre gêneros (JORDAN, 1984; MOREIRA; PEREIRA, 2001). Além destas, outras características utilizadas são produção de exopolissacarídeos, tamanho, cor, borda, forma e aspecto da colônia. (VINCENT, 1970; MOREIRA *et al.*; 1993, ODEE *et al.*, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Consórcios utilizados

Foram utilizados consórcios degradadores de resíduo celulósico da biomassa, o qual está disponível e estabilizado no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas – LBMP, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), para isolamento e caracterização de bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico como celulases, amilases, lípases, proteases e bactérias solubilizadoras de fosfato. Os consórcios foram formados de solo contendo palhada ou bagaço de cana-de-açúcar em decomposição. Esses consórcios bacterianos foram mantidos em meio líquido de Bushnell-Haas, BHB (BUSHENEL; HAAS, 1941) contendo como fonte de carbono carboximetil celulose, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho ou casca de amendoim triturado.

3.2. Isolamento dos micro-organismos

O isolamento dos micro-organismos foi realizado através da técnica de diluição seriada e cultivo em meio sólido. Utilizando os consórcios que foram cultivados em meio líquido, BHB (BUSHENEL; HAAS, 1941) contendo como fonte de carbono carboximetilcelulose, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho ou casca de amendoim triturado, agitado a 100 rpm, 28°C durante 7 dias.

Foram utilizados dez tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, estéreis e contendo 900 µl de solução salina 0,85% (autoclavada). Ao primeiro tubo foram pipetados 100 µl da amostra original do consórcio e a suspensão foi agitada em agitador. Desse primeiro tubo foram pipetados 100 µl e adicionado no segundo tubo de microcentrífuga, o qual foi tampado e agitado no agitador. Essa sequência foi repetida até chegar ao décimo tubo (diluição 10^{-10}).

Foram inoculadas as diluições de 10^{-5} a 10^{-10} , 100 µl foram inoculadas em Placas de Petri contendo meio de cultivo PEG, descrito na TABELA 1. Foram inoculadas três placas de cada diluição sendo as placas mantidas em BOD durante

dois dias. Após esse período, foi realizada a contagem de colônias, e a transferência destas para outra placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Foram mantidas em BOD, a 28°C durante dois dias, e os isolados foram transferidos para tubos de fundo cônico contendo 5 ml de meio de cultivo líquido. Estes foram mantidos em agitação (100 rpm, a 28°C), durante dois dias. Após esse período foi realizado o estoque da suspensão bacteriana, utilizando tubos de microcentrífuga com 200 µl de glicerol puro e 800 µl da suspensão, os tubos foram estocados a -80°C.

Tabela 1: Composição do meio de cultivo PEG utilizado para o isolamento do consórcio.

Componente	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de levedura	1
Glicose	10
pH	6,8

3.3. Avaliação do perfil eletroforetico de alfa esterase

Bactérias cultivadas foram lavadas, por centrifugação (300 rpm por 5 min), com solução de NaCl 1% e 0,5 mL de Tampão TRIS-HCl (0,1M pH 7,2) contendo 5mM MgCl₂, 1% de glicerol e 0,1% de β-mercaptoetanol. Após lavagem as bactérias, sedimentadas por centrifugação, foram suspensas em 0,5 mL do tampão TRIS-HCl, anteriormente referido, contendo 1 mg/mL de lisozima, e incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. A suspensão foi novamente submetida à centrifugação e o sedimentado suspenso em 0,5 mL de tampão de sonicação (0,01M TRIS-HCl pH 8,8 com 15% de glicerol) foi submetido à ação de um aparelho de ultrassom Branson Sonifier 250 (pulsos de 10 segundos, 60 W, por 10 minutos). As suspensões foram então centrifugadas (300 rpm por 20 min, a 4°C), os sobrenadantes separados e armazenados, em volumes de 0,5 mL a -80°C, para posterior análise, por eletroforese (LAEMMLI, 1970).

Foi empregado o sistema de tampão descontínuo para eletroforese em gel de poli-acrilamida na separação das isoenzimas presentes nos vários extratos proteicos.

A concentração de acrilamida no gel concentrador foi de 5% e no gel separador de 12% (para esterases) e 8% para demais sistemas; o gel não desnaturante não continha SDS. Foram transferidos 20 μ L de cada amostra (extrato contendo 100 μ g de proteína) e o volume de cada poço foi cuidadosamente completada com a mesma solução tampão utilizada nos eletrodos (0,012M TRIS e 0,095M glicina, pH 8,8). A eletroforese foi conduzida por 15 horas, a 4°C, com voltagem constante de 200 v.

Para a detecção de α -esterase os géis foram tratados com 100 mL tampão fosfato (0,1M pH 6,2) contendo 100 mg de Fast Blue RR e 60 mg de α -naphthyl acetato, previamente dissolvido em 0,5 mL de acetona. Obtida a coloração, os géis foram lavados com 300 mL de uma solução descorante (90 mL de etanol 30% (v/v); 15 mL de ácido acético 5% (v/v) e 195 mL de água deionizada) (PASTEUR *et al.*, 1988).

3.4. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio de cultivo PEG durante dois dias, sob agitação de 100 rpm, 28°C. A suspensão bacteriana foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado para a extração de DNA genômico (MARMUR,1961). A extração de DNA genômico dos isolados foi realizada em tubo de microcentrífuga de 2,0 mL. Foi adicionado ao precipitado 500 μ L de NaCl (0,85%), foi suspenso, e adicionou-se 40 μ L de lizozima (20 mg/mL), foi agitado no agitador e adicionado 13 μ L de RNAse (10 mg/mL), após isso o tubo de microcentrífuga permaneceu no banho-maria a 37°C durante duas horas. Adicionou 35 μ L de SDS 25% e foi agitado manualmente por cinco minutos. Adicionou 158 μ L de solução acetato de sódio (3M, pH 5) gelada e foi novamente agitado manualmente durante cinco minutos. Adicionou 650 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e foi agitado manualmente durante cinco minutos. Centrifugou a 12000 rpm durante vinte e cinco minutos a 4°C. Foi coletada a fase superior e transferida para outro tubo, ao qual foi adicionado dois volumes de etanol absoluto gelado e misturado por inversão. Permaneceu aproximadamente 15 horas a -20°C. Após esse período o tubo foi centrifugado a 12000 rpm, durante trinta minutos, a

4°C. Descartado o sobrenadante, foi adicionado ao pellet 1 mL de etanol 70%. Foi centrifugado a 12000 rpm durante cinco minutos a 4°C. O álcool foi descartado, o tubo foi invertido sobre papel para secar e, posteriormente foi suspenso novamente em 200 µL de solução TE (10mM TrisHCl, 1 mM EDTA- pH 7,4).

3.5. Eletroforese e quantificação do DNA

A qualidade dos DNAs obtidos na extração foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada em uma cuba com uma alíquota de 3 µL de DNA e adicionado 3 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)] e conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89mM; Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM, pH 8,3) a 100V. O gel foi visualizado em luz UV e a imagem foi foto documentada em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad USA). O DNA obtido também foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para a determinação da concentração e pureza da amostra.

3.6. Amplificação do gene 16S rRNA

Os DNAs extraídos e quantificados foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA bacteriano pela reação contendo tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], 1,5 mM de MgCl₂, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, Taq DNA polimerase (Fermentas) e água ultra pura para completar um volume final de 20 µL. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por, (WEISBURG *et al.*, 1991) *fD1* "forward" (5'-CCg AAT TCg TCg 33 ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g – 3) e o *rD1* "reverse" (5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA ggT gAT CCA gCC -3'). As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa: 95°C, por 1 minuto; 39 ciclos de 95°C por 2 minutos, 36°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C. A quantificação e visualização do produto de PCR 16S rDNA (1500pb) foi realizado em gel de agarose

a 1,5% juntamente com um marcador de 1500 pb e fotodocumentadas no aparelho Gel Doc (Bio Rad).

3.7. Eluição dos produtos de PCR

O produto da reação PCR foi submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA). A cuba foi descontaminada com solução hipoclorito de sódio 5%, durante trinta minutos e, lavada com água corrente para a retirada do excesso de hipoclorito de sódio. A seguir foi esterilizada em fluxo laminar sobre luz UV, durante vinte minutos. A região do gel contendo o inserto de 1500 pares de base foi marcada e cortada utilizando uma lâmina de bisturi, sendo transferida para um tubo eppendorf de 2 mL. A recuperação dos fragmentos de DNA do gel de agarose foi realizada com a utilização do kit 'Wizzard SV gel and PCR Clean-Up System'-Promega, de acordo com as especificações do fabricante. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% em tampão TEB 1X, adicionado brometo de etídio (0,5 µg/mL), com o objetivo de verificar a qualidade do DNA recuperado. A determinação da pureza e concentração da amostra foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-100.

3.8. Sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas, utilizando-se o volume final de 10 µL contendo: 2,0 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada; 1,0 µL de Big Dye (ABI PRISM Big Dye Terminator kit - Applied Biosystems, EUA); 4,0 µL de tampão 10X; 1,0 µL de oligonucleotídeo iniciador FD1 ou RD1 (na concentração de 5 pmol µL⁻¹) e 2,0 µL de amplicon do DNA (na concentração de 60 ng) (PAIXÃO, 2010).

As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador, utilizando-se o seguinte perfil térmico: 96°C por 2 minutos; 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos, 60°C por 4 minutos e um ciclo final a 4°C. Em seguida, os fragmentos de DNA foram precipitados e os dNTPs marcados

por fluorescência não incorporados, foram retirados por sucessivas lavagens. Para a precipitação do DNA amplificado marcado pela PCR de sequenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (v/v) às amostras; as placas foram agitadas, cuidadosamente, em agitador por alguns segundos, incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 20°C por 45 minutos, a 300 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e 150 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 5 minutos na mesma temperatura e força centrífuga descrita anteriormente, os sobrenadantes foram descartados e as placas secas em Concentrador plus (Eppendorf). Para a aplicação no sequenciador, as amostras foram suspensas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI PRISM), submetidas à desnaturação por 5 minutos, a 95°C. O sequenciamento foi realizado em aparelho de capilar modelo 3100 DNA Analyzer ABI Prism.

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa “Sequencing Analysis 3.4” e “Phred/Phrap” (GORDON, 2008) com nível de exigência mínima de 400 bases com qualidade Phred acima de 20. As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências do banco de dados do ‘Ribosomal Database Project’ (RDP) pela ferramenta ‘Classifier’; do GenBank (“National Center for Biotechnology Information”), usando a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tools”, ALTSCHUL *et al*, 1997) e do SILVA database. As análises de agrupamento foram feitas pelos softwares CLUSTAL X e MEGA 5.05 usando o método de neighbor-joining e bootstrap de 1000 repetições para a construção dos dendrogramas.

3.9. Avaliação da produção das enzimas

A produção das enzimas foi determinada pela medida de halo ao redor das bactérias cultivadas e dos consórcios. A avaliação da produção de celulases foi realizada através do cultivo dos isolados cultivados em meio PEG e do consórcio em meio BHB contendo CMC, por sete dias. Após o cultivo a detecção da enzima celulase foi avaliada pela coloração das placas segundo (WOOD *et al*; 1982).

A produção de amilase foi avaliada utilizando-se meio amido-ágar e a produção de protease utilizando-se meio YMA com leite (SOUZA *et al*., 2008).

As lipases foram avaliadas pelo cultivo dos isolados meio sólido segundo (SIERRA, 1957). O teste de produção de solubilização de fosfato foi realizado cultivando-se as bactérias em meio sólido NBRIP (NAUTYAL, 1999).

Todas as placas foram inoculadas com 25 µL de suspensão bacteriana, que foram cultivadas em meio PEG durante dois dias, 100 rpm, 28°C. Os meios foram incubados a 28°C em estufa tipo BOD durante 5 dias. Após cinco dias de incubação foram medidos o diâmetro das colônias bacterianas e dos halos formados através de paquímetro. A atividade enzimática extracelular ou índice de atividade enzimática (IE) foi calculado pela relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio das colônias (SHARMA *et al.*, 2002).

3.10. Avaliação das características morfológicas e alteração de pH

A caracterização microbiológica dos isolados foi realizada através da observação das características morfológicas das colônias crescidas em meio sólido YMA (VICENT, 1970) em placas de Petri (cor, forma da colônia e da borda, brilho e consistência da colônia e produção de goma). Foi utilizado meio sólido YMA adicionado azul de bromotimol (25 µg/ml) para e visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor do meio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento do consórcio e avaliação isoenzimática

Os consórcios bacterianos cultivados com diferentes fontes de biomassa apresentaram capacidade de produzir diferentes enzimas em meio sólido. Dentre as avaliadas observou-se a produção de bactérias solubilizadoras de fosfato, lipase, amilase e celulase (FIGURA 1). Considerando o interesse atual do uso dessas moléculas em processos de utilização da biomassa para produção de etanol ou biodiesel, assim como em áreas agrícolas para a solubilização de fosfato, isolados bacterianos foram obtidos desse material biológico e avaliados quanto à produção de celulases, amilases, lipases, proteases e enzimas solubilizadoras de fosfato.

Através da metodologia de cultivo em meio contendo glicose foram obtidos 81 isolados dos consórcios degradadores de biomassa. Considerando-se que muitos desses organismos possuíam características morfológicas similares optou-se por selecionar para as análises de produção de enzimas aqueles que possuísem diferentes perfis de alfa-esterase. O perfil isoenzimático em gel de amido ou poliacrilamida tem sido uma ferramenta útil de classificação preliminar de micro-organismos há muitas décadas e dentre as enzimas estudadas encontram-se as esterases (CARNEIRO *et al.*, 2000). Os marcadores isoenzimáticos geralmente fornecem ampla informação genética para várias aplicações (AUGUSTIN *et al.*, 1999).

A análise eletroforética da alfa-esterase dos 81 isolados, revelou que vários deles apresentaram o mesmo perfil, o que sugeriu que esses micro-organismos pudessem ser as mesmas bactérias. Pode-se observar que dentre os organismos foi possível identificar 16 perfis de alfa-esterase diferentes (FIGURA 2). Desta forma, 16 isolados que apresentaram essas características isoenzimáticas distintas foram selecionados para a identificação e avaliação quanto à sua capacidade de produzir diferentes enzimas celulases, amilase, lipase, protease e de solubilizar fosfato *in vitro*.

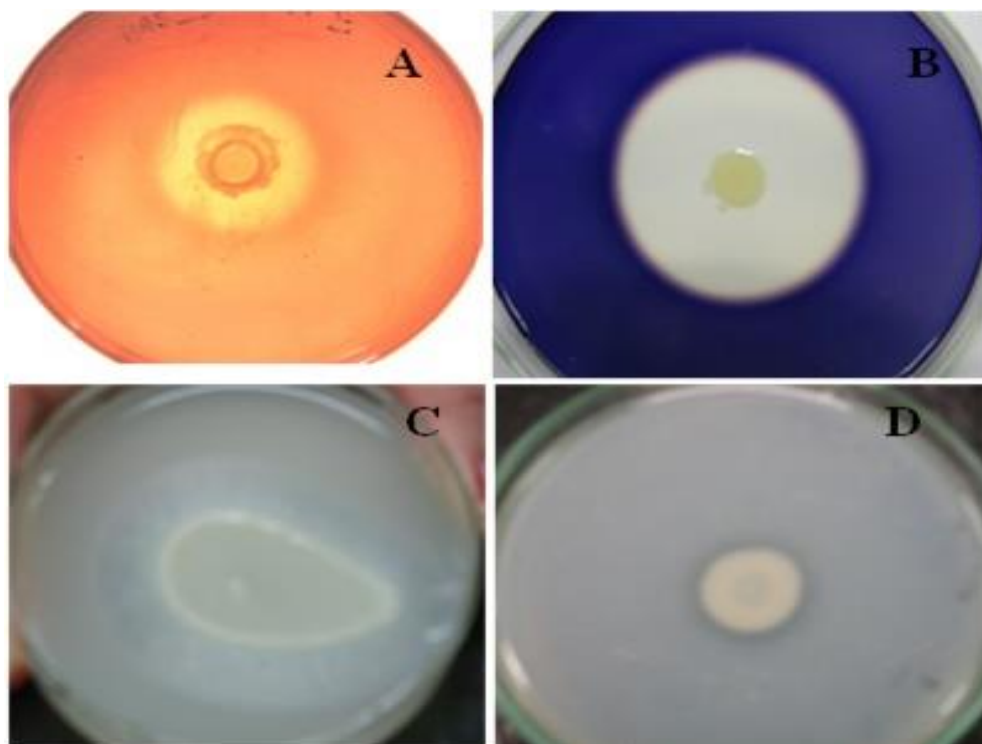


Figura 1: Halo indicativo da produção de enzimas A: produção de celulase. B: produção de amilase. C: solubilização de fosfato. D: produção de lipase, por células do consórcio bacteriano em meio contendo CMC, Amido, Fosfato de Cálcio e óleo de oliva, respectivamente.

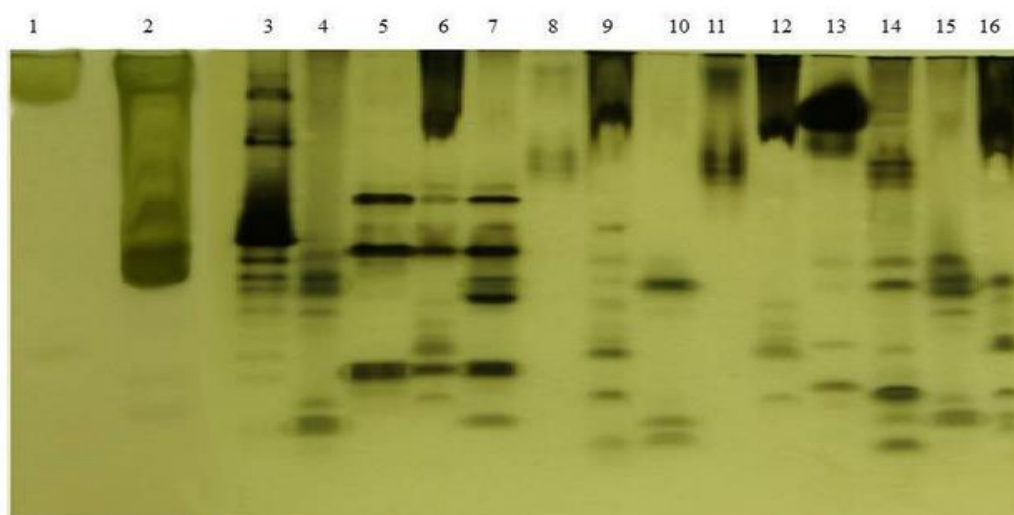


Figura 2: Diferentes Perfis eletroforético de α -esterase dos isolados. Canaletas: (1) AB4, (2) CB10, (3) AB6, (4) AS1, (5) AS2, (6) AS3, (7) CB2, (8) CB8, (9) CB9, (10) CB11, (11) CS13, (12) MB5, (13) MS2, (14) MS3, (15) MS4, (16) MS5.

4.2. Avaliação das enzimas

Os resultados da detecção de diferentes enzimas pelos isolados selecionados podem ser observados na TABELA 2 e FIGURA 3. Nas condições determinadas nenhum micro-organismo foi capaz de formar halo determinando a produção de celulase. Por outro lado foi detectada a produção das enzimas amilase, protease, lipase e solubilizadoras de fosfato.

Somente sete isolados foram capazes de degradar amido, o isolado MS3 apresentou o maior halo (3,6 cm). As amilases têm uma ampla gama de aplicações industriais, tais como fabricação de ração animal, indústria de papel, indústria têxtil, indústria de alimentos e energia renovável (SUN *et al.*, 2007).

A protease foi encontrada em oito micro-organismos, o tamanho do halo entre eles foi igual (1,1cm), com exceção do isolado CB9 que apresentou um halo de 1,7cm. As proteases são utilizadas na indústria farmacêutica para a preparação de medicamentos, como pomadas para o tratamento de feridas (BHOSALES *et al.*, 1995).

A produção de lipase foi observada em onze micro-organismos, o isolado CB8 apresentou o maior halo (2,7cm). As lipases são enzimas que têm aplicações importantes na área de biotecnologia, especialmente na produção de bioenergia, onde o setor encontra-se em expansão, resultado do aumento da demanda mundial de energia renovável (COLLA *et al.*, 2010).

A solubilização de fosfato foi observada em todos os organismos, destacando-se o isolado MS3 que apresentou o maior halo (2,5 cm). As bactérias solubilizadoras de fosfato são um grupo diversificado de bactérias não relacionadas capazes de solubilizar prontamente formas fracamente solúvel de fósforo (KHAN *et al.*, 2006).

Destaque para os isolados AS2, CB9 e MS5 que produzem amilase, protease, lipase e são capazes de solubilizar o fosfato de cálcio.

A produção de celulase apesar de ter sido observada nos consórcios formados não foi observada em nenhuma das bactérias isoladas através da metodologia aplicada. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que micro-organismos em cultura pura regularmente demonstram atividades

lignocelulosicas insatisfatórias (KIM *et al.*, 2006). Segundo Boisset *et al.* (2001), misturas de vários tipos de enzimas que atuam cooperativamente provou ser uma estratégia eficaz para melhorar a digestão de resíduos celulósicos.

Além desses achados na literatura ensaios iniciais do sequenciamento do DNA total dos micro-organismos participantes no consórcio bacteriano demonstraram a presença de 3 hits diferentes para as enzimas celulase (EC 3.2.1.4) e beta-glicosidase (EC 3.2.1.21), enzimas envolvidas na degradação de celulose.

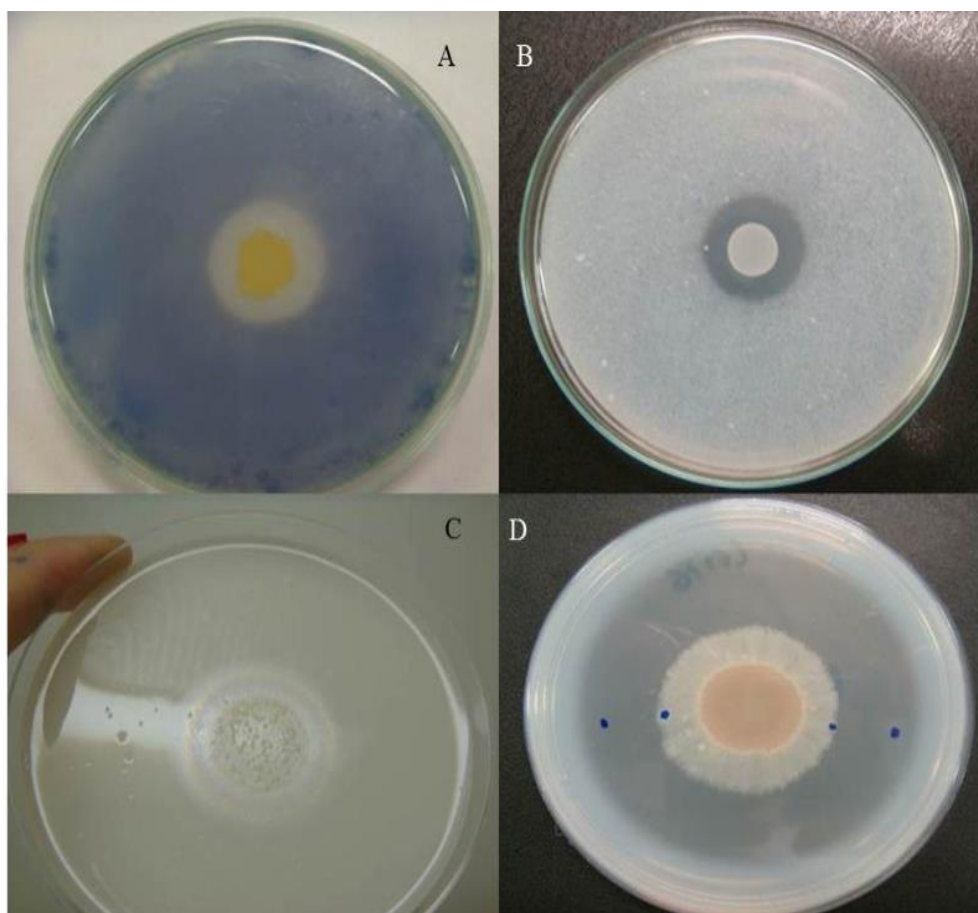


Figura 3: Halo indicativo da produção de enzimas A: produção de amilase, B: solubilização de fosfato, C: produção de lipase, D: produção protease, por células do consórcio bacteriano em meio contendo amido, fosfato de cálcio, óleo de oliva e leite, respectivamente.

4.3. Identificação dos micro-organismos

Os isolados foram submetidos à análise de identificação por sequenciamento do gene 16s rRNA, as sequências foram comparadas com os bancos de dados

(TABELA 3). Esses dados mostram que através da comparação das sequências parciais obtidas com as sequências depositadas no RDP só foi possível classificar os organismos dentro de gêneros bacterianos. Por outro lado usando outros bancos de dados (Silva Database e NCBI) consegue-se classificar os micro-organismos em espécies.

Tabela 2: Índice de atividade enzimática (IE) calculado após 5 dias de cultivo dos isolados em relação a produção de celulase, amilase, protease, lipase e de solubilizar fosfato.

Isolado	IE*				
	Celulase	Amilase	Protease	Lipase	Sol.Fosfato
AB4	0,0	1,8	0,0	1,7	1,5
AB6	0,0	0,0	0,0	1,7	1,4
AS1	0,0	0,0	0,0	1,8	1,3
AS2	0,0	1,8	1,1	1,5	1,2
AS3	0,0	1,5	0,0	0,0	1,8
CB2	0,0	0,0	1,1	1,7	1,2
CB8	0,0	0,0	0,0	2,7	1,5
CB9	0,0	2,1	1,7	1,9	1,4
CB10	0,0	0,0	1,1	0,0	1,4
CB11	0,0	0,0	1,1	0,0	1,3
CS13	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
MB5	0,0	0,0	1,1	1,7	1,3
MS2	0,0	0,0	0,0	1,8	1,6
MS3	0,0	3,6	0,0	1,5	2,5
MS4	0,0	1,7	1,1	0,0	1,6
MS5	0,0	1,6	1,1	1,7	1,7

* IE = Índice de atividade enzimática - é a razão entre o diâmetro do halo de atividade enzimática (cm) e o diâmetro da colônia (cm) medidos após 5 dias de cultivo.

Utilizando os dados de identificação bacteriana (TABELA 3 e FIGURA 4) observou-se que 100% dos isolados são do domínio Bactéria, sendo que 25% pertencem ao filo Firmicutes e 75% ao filo das Proteobacterias. Dentro do filo Firmicutes 100% dos organismos pertencem ao gênero dos *Bacillus* e são os

isolados: MS3, CB9, CB11 e CB2. No filo das Proteobacterias, 8,3% pertencem à classe das Alfaproteobacterias, 8,3% a classe das Gammaproteobacteria e 83,3% são Betaproteobacteria.

Um micro-organismo pertence classe Alfaproteobacterias e foi classificado como gênero *Asticcacaulis*, o isolado CS13. Da classe da Gammaproteobacteria o micro-organismo AS3 foi classificado como um organismo do gênero *Pseudomonas*. As classes das Betaproteobacterias têm isolados de dois gêneros, o gênero *Pandoraea* com os isolados AB6, MS5, MS4 e CB10 e o gênero *Burkholderia* com os isolados MS2, AS2, AB4, MB5, AS1 e CB8.

Quando se compara a classificação dos micro-organismos utilizando-se o banco de dados SILVA e NCBI (TABELA 3) pode-se observar diferenças entre os resultados obtidos com exceção do isolado AS3 e CS13 classificados como *Pseudomonas putida* e *Asticcacaulis taihuensis*, respectivamente. Desse modo foi construído um dendrograma de agrupamento hierárquico para que esses isolados pudessem ser classificados adequadamente (FIGURA 4).

O isolado AS3 foi identificado com sequências de *Pseudomonas putida* em ambos os bancos de dados, porém os números de acesso são diferentes L28676 (SILVA) e NR074596 (NCBI). Esta bactéria participa de atividades metabólicas importantes para o meio ambiente, incluindo o ciclo e a degradação de poluentes biogênicos e xenobióticos (TIMMIS, 2002). Tem potencial para aplicações biotecnológicas, particularmente em áreas de biorremediação, biocatálises, como agente de controle em plantas e para a produção de bioplásticos (NELSON *et al.*, 2002).

Por sua vez, o micro-organismo CS13 foi identificado com sequências de *Asticcacaulis taihuensis* em ambos os bancos de dados, e possuem os mesmos números de acesso, AY5000141. É uma bactéria gram-negativa, aeróbia, possui células não formadoras de esporos. Motilidade com um único flagelo polar e capacidade de hidrolisar amido. As células crescem bem em concentrações de NaCl inferiores a 20 g/L (ZHI-PEI *et al.*, 2005).

Os isolados (AS1, AS2, AB4, CB8, MB5 e MS2) classificados como *Burkholderia sp* no banco SILVA apresentaram a mesma classificação dentro de espécies quando no banco do NCBI. As sequências do NCBI foram incorporadas

mais recentes a esse banco, porém ele é menos exigente para a recepção de dados, considerando-se que todos os micro-organismos se mostraram agrupados na mesma chave de *Burkholderia sp* na análise de agrupamento (FIGURA 3). Esse agrupamento pode sugerir que os isolados desse trabalho podem ser espécies ainda não totalmente classificadas.

As diferentes espécies bactérias que pertencem ao gênero *Burkholderia* formam um grupo específico dentro das Betaproteobacterias, mas com pequenas diferenças na sequência do gene 16S rRNA. Os membros do gênero *Burkholderia* são organismos versáteis que ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos. Essas bactérias são usadas para controle biológico, processos de biorremediação e como estimuladores do crescimento de plantas, entretanto podem apresentar um componente patogênico humano em pacientes com fibrose cística.

O isolado CB8 foi identificado como *Burkholderia sp* no SILVA e *Burkholderia fungorum* no NCBI, sendo a sequência do NCBI mais recente (Janeiro/2009). *Burkholderia fungorum* é gram negativa, não esporulante. Cresce em 30°C e na presença de 0,5% de NaCl e foi relacionada à degradação de compostos aromáticos derivados da lignina (COENYE *et al.*, 2001). Os micro-organismos MB5 e MS2 foram identificados com sequências de *Burkholderia sp* no SILVA e *Burkholderia glathei* no NCBI, sendo a sequência do NCBI mais recente esse isolado poderia estar relacionado com a mobilização de fósforo inorgânico e ferro a partir de fosfato tricálcio (CALVARUSO *et al.*, 2007).

Os isolados CB10, AB6, MS4 e MS5 foram identificados com sequências de *Pandoraea sp* no SILVA e *Pandoraea pulmonicola* no BLAST, ambos possuem mesmo número de acesso EU090895 (SILVA) e NR028750 (NCBI), sendo a sequência depositada no NCBI mais recente (Novembro/2009). *Pandoraea pulmonicola* é gram negativa, não esporulante. Ocorre isoladamente e é móvel por meio de um único flagelo polar; a atividade da catálise está presente, o crescimento é observado em 30 e 37°C. Não utiliza maltose, sacarose ou amido (COENYE *et al.*, 2001).

Um grande grupo foi formado com organismos do filo Firmicutes (FIGURA 4) onde as sequências do gene 16S rRNA de bactérias classificadas como do gênero *Bacillus* ficaram agrupadas sem diferenças. Nesse grupo encontram-se *Bacillus sp*,

Bacillus cereus, *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*, juntamente com 4 isolados CB2, CB9, CB11 e MS3 classificados distintamente entre os dois Banco de dados (Silva e NCBI). Na literatura observa-se que esses organismos fazem parte de um grupo comum com características similares, produção de esporos e muitas proteínas homólogas (READ *et al.*, 2003). Os *Bacillus* são bactérias produtoras de várias classes de enzimas e com uma grande utilidade em processos de controle biológico.

Tabela 3: Resultado da comparação das sequencias 16S rRNA com sequencias depositadas no Ribossomal Database Project (RDP) e nos bancos de dados SILVA e NCBI.

ISOLADO	RDP (Gêneros)	SILVA	NCBI
AB4	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia sordidicola</i>
AB6	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea sp</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
AS1	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia sabiae</i>
AS2	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia bryophila</i>
AS3	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
CB2	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus cereus</i>
CB8	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia fungorum</i>
CB9	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
CB10	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea sp</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
CB11	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
CS13	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Asticcacaulis taihuensis</i>	<i>Asticcacaulis taihuensis</i>
MB5	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia glathei</i>
MS2	<i>Pandoraea</i>	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Burkholderia glathei</i>
MS3	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereu</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
MS4	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea sp</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
MS5	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea sp</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>

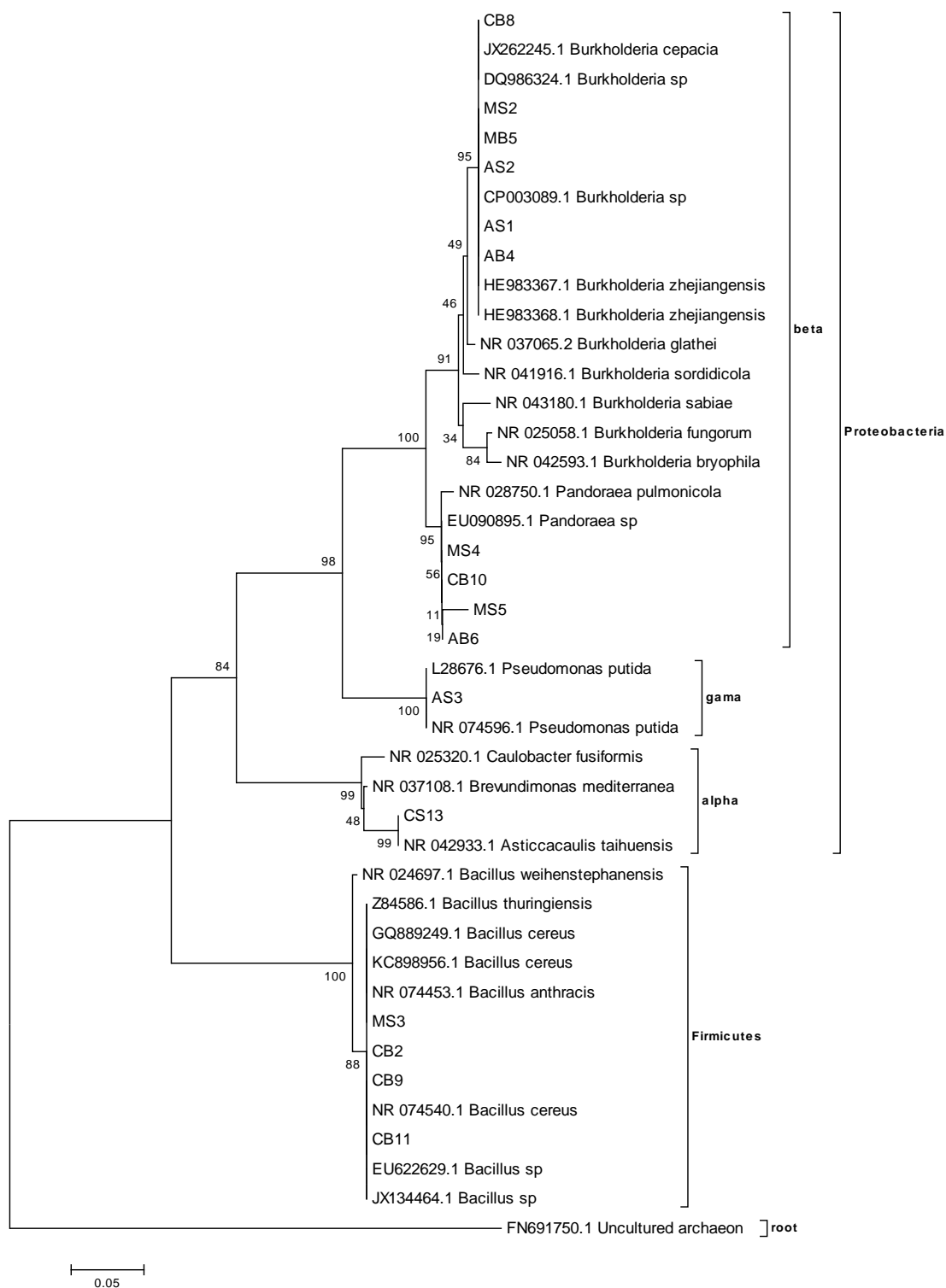


Figura 4: Dendrograma do agrupamento hierárquico baseada na sequência parciais do gene 16S rRNA, comparando os isolados com sequências depositadas no banco de dados. Obtido pelo método de Neighbor-Joining, com bootstrap de 1000 vezes.

4.4. Caracterização morfológica

Foi realizado o estudo morfológico das colônias, verificando as características que os micro-organismos apresentam ao crescer em meios de cultura as quais são expressões fenotípicas do seu material genético e, portanto, são úteis na sua identificação. Embora muitas vezes elas sejam consideradas de importância secundária e utilizadas apenas na identificação preliminar, em muitos casos elas são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies (ANDRADE, 2008). Na TABELA 4 estão apresentadas as características morfológicas observadas para os isolados.

Houve um predomínio de bactérias de coloração clara, sendo a maioria esbranquiçada, e algumas de coloração amarela. Foram observadas colônias achatadas, elevadas e convexas; com bordas puntiforme, circular ou lisa e irregular. Em relação a umidade, 50% das colônias são secas e 50% são úmidas e apresentam aspecto opaco e translúcido. A maioria das colônias não produz goma. Em relação à reação de pH, 50% das bactérias são produtoras de ácidos, e 50% produtoras de base (FIGURA 5).

As bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam cor da colônia branca, não produzem goma, o formato da borda da colônia varia em circular e puntiforme. Os isolados do gênero *Pandoraea* apresentam colônias brancas, algumas produzem goma, apresentam variedade no formato da colônia irregular, puntiforme e circular. As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam colônia amarela, não produzem goma, apresentam formato da borda irregular e circular. Dentro destes grupos há bactérias produtoras de ácido e base. O isolado do gênero *Pseudomonas* apresenta colônia branca, produz goma, formato da colônia circular, produz ácido. O gênero *Asticcacaulis* apresenta colônia branca, produz goma, colônia com formato circular, produz ácido.

Tabela 4: Avaliação morfológica dos isolados e avaliação quanto a produção de ácido/base.

Bactéria	Cor	Elevação	Borda	Opaca/ translúcida	Úmida/seca	Goma	ácido/ alcalino
AB4	Branca	Convexa	Puntiforme	Opaca	Úmida	Ausência	Ácido
CB10	Branca	Convexa	Irregular	Opaca	Úmida	Ausência	Alcalino
AB6	Branca	Achatada	Irregular	Opaca	Seca	Ausência	Alcalino
AS1	Branca	Achatada	Circular	Opaca	Seca	Ausência	Ácido
AS2	Branca	Achatada	Circular	Opaca	Seca	Ausência	Alcalino
AS3	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Úmida	Presente	Ácido
CB2	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Seca	Ausência	Alcalino
CB8	Branca	Convexa	Circular	Opaca	Úmida	Ausência	Alcalino
CB9	Branca	Convexa	Circular	Opaca	Seca	Ausência	Ácido
CB11	Amarela	Achatada	Circular	Opaca	Úmida	Ausência	Alcalino
CS13	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Úmida	Presente	Ácido
MB5	Branca	Achatada	Puntiforme	Opaca	Seca	Ausência	Ácido
MS2	Branca	Convexa	Puntiforme	Opaca	Úmida	Ausência	Ácido
MS3	Amarela	Convexa	Irregular	Opaca	Úmida	Ausência	Alcalino
MS4	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Úmida	Presente	Ácido
MS5	Branca	Achatada	Circular	Opaca	Seca	Ausência	Alcalino

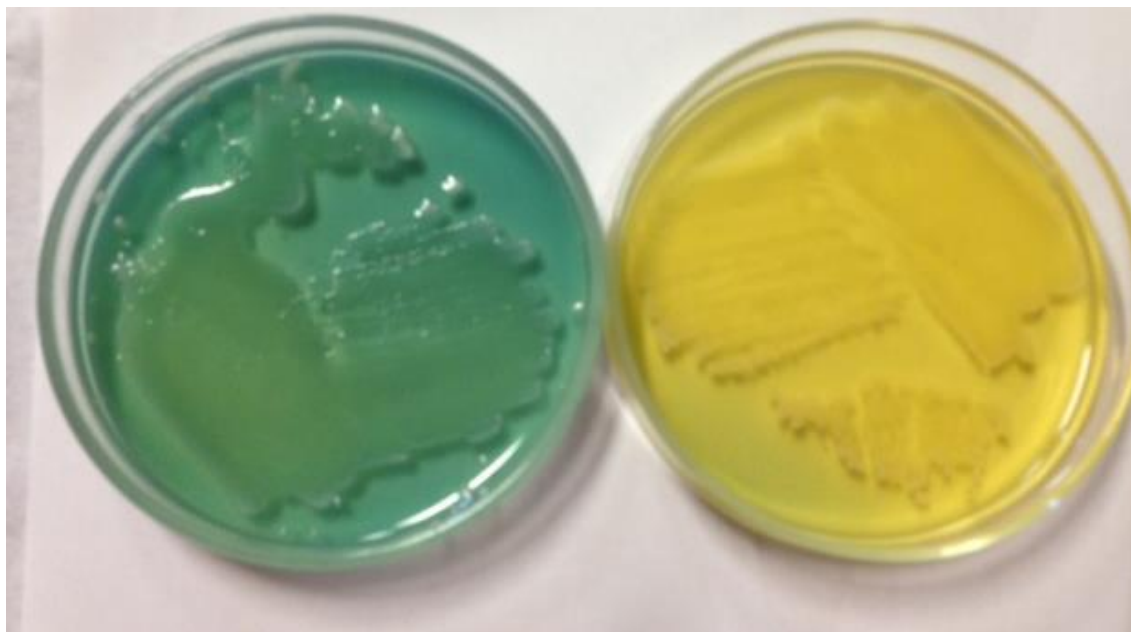


Figura 5: Teste de produção ácido/base em meio YMA, coloração verde indica a produção de base e coloração amarela indica a produção de ácido pela bactéria inoculada.

5. CONCLUSÕES

Os consórcios estudados apresentavam capacidade de degradar celulose, amido, lipídios, proteínas além de solubilizar fosfato.

A partir dos consórcios isolou-se 81 bactérias das quais 16 eram de gêneros diferentes.

As bactérias isoladas não foram capazes de degradar celulose.

As bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Pandoraea* produziram amilase.

As bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Bacillus* e *Pandoraea* produziram protease.

As bactérias do gênero *Burkholderia*, *Pandoraea* e *Bacillus* produziram lipase.

Todos os gêneros isolados solubilizam fosfato.

6. REFERÊNCIAS

- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **J Bacteriol**, Cambridge, v.186, n. 9, p.2629–2635, 2004.
- ALAM, M. M; LADHA, J. K. Optimizing Phosphorus Fertilization in an Intensive Vegetable–rice Cropping System. **Biol Fertil Soils**, Philippines, v.40, n. 4, p.277–283, 2004.
- ALFENAS, A. C; BRUNE, W; OLIVEIRA, J.R; KUNIEDA, S; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e micro-organismos. Viçosa: UFV, 1988. p. 85-113.
- ALONSO, F. O. M; OLIVEIRA, E. B. L; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Improvement of Lipase Production at Different Stirring Speeds and Oxygen Levels. **Braz J Chem Eng**, São Paulo ,v.22, n.01, p.9–18, 2005.
- ALVIRA, P; TOMA´S-PEJO´, E; BALLESTEROS, M; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour Technol**, Madrid, v.101, n.4851–4861, 2010.
- ANDRADE, D.M. Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 179-204.
- ARPIGNY, J. L; JAEGER, K. E. Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. **Biochem J**, Bochum, v.343, p.177–183, 1999.
- ATLAS, M. R. Microbiol degradation of petroleum hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. Hooken, v. 80, p. 723- 736, 2005.

AUGUSTIN, E; LOECK, A. E; STORCH, G; GRUTZMACHER, D. D; AFONSO, A. P. S; GUSMÃO, L. G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Ver. Bras. De Agrociência**, v.5, n. 2, p.217-220, 1999.

BHAT, M. K ; BHAT, S. Cellulose Degrading Enzymes and their Potential Industrial Applications. **Biotechnol Adv**, Reading, v.15, n. 3/4, p. 583–620, 1997.

BENJAMIN, S; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, Trivandrum, v.14, n.12, p.1069–87, 1998.

BEDDINGTON, J. Food security: contributions from science to a new and greener revolution. **Philos. Trans. R. Soc. B**, v. 365, p. 61–71, 2010.

BRENNER, K; YOU, L; ARNOLD, F. H. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends in biotechnology**, Durham, v.26, n.9, p. 483-489, 2008.

BOISSET, C; PETREQUIN, C; CHANZY, H; HENRISSAT, B; SCHULEIN, M. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for biodegradation of crystalline cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, France v. 72, n.3 p.339–45. 2001.

BHOSALES, S. H; RAO, M. B; DESHPANDE, V. V; SRINIVASAN, M. C. Thermostability of high activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus coronatus* (NCL 86.8.20). **Enzyme Microbial Technology**, India, v.17, n.2, p.136–139, 1995.

BON, E. P. S; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p.506.

BORNSCHEUER, U. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis **FEMS Microbiology Reviews**, Greifswald. V.26, n. 26 ,p.73-81, 2002.

BURKERT, J. F. M; MAUGERI, F; RODRIGUES, M. I. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Geotrichum* sp. Using Factorial Design. **Bioresource Technology**, Campinas, v.91, n.1, p.77–84, 2004.

BUSHNELL, L. D; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v.41, n.5, p.653-673, 1941.

CALVARUSO, C; TURPAULT, M. P; LECLERC, E; FREY-KLETT, P. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. **Microbial Ecology**, France, v. 54, n.3, p. 567–577,2007.

CANTAREL, B. L; COUTINHO, P. M; RANCUREL, C; BERNARD, T; LOMBARD. V; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active ENZYMES database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, Marseille, v. 37, D233-D238, 2009

CARNEIRO, R. M. D. G; LIMA, R. D. A; CASTRO, J. M. C. Variabilidade Isoenzimática de Populações de *Meloidogynem spp.* Provenientes de Regiões Brasileiras Produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, Lavras, v. 27, n.1, p.1-12, 2003.

COENYE, T; FALSEN, E; HOSTE, B; OHLEN, M; GORIS, J; GOVAN, J. R. W; GILLIS, M; VANDAMME, P. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. Nov.; *Pandoraea pulmonicola* sp. Nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. Nov., *Pandoraea sputorum* sp. Nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Britain, v. 50, p. 887-899, 2000.

COENYE, T., VANDAMME, P., GOVAN, J. R. W. & LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, United Kingdom, v. 39, n.10, p.3427–3436, 2011.

COLLA, L. M; RIZZARDI, J; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O; BERTOLIN, T. E; VIEIRA COSTA, J. A. Simultaneous Production of Lipases and Biosurfactants by Submerged and Solid-state Bioprocesses. **Bioresource Technology**, Rio Grande do Sul, v.101, n.21, p.8308–14, 2010.

COOPER, G. M. Physiology of the bacterial cell: A Molecular Approach. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. p. 506.

COSTA, L. N. F.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, L. G. S. M.; ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de

fermentos biológicos comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*) Dr. Oetker e Dona Benta. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012.

CHU, W. H. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from *Bacillus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Republic of Corea, v.38, p. 241–245, 2007.

DELVASTO, P; VALVERDE, A; BALLESTER, A; IGUAL, J. M; MUÑOZ, J. A; GONZÁLEZ, F; BLÁZQUEZ, M. L; GARCÍA, C. Characterization of Brushite as a Recrystallization Product Formed During Bacterial Solubilization of Hydroxyapatite in Batch Cultures. **Soil Biology Biochemistry**, Madrid, v.38, n.9, p.2645–2654, 2006.

DE VRIES, R. P; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology Molecular Biology**, The Netherlands, v.65, n. 4, p.497–522, 2001.

ELIBOL, M; OZER, D. Influence of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Rhizopus Arrhizus*. **Process Biochemistry**, Turkey, v.36, n.4, p.329–52, 2000.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010

FIGUEIREDO, H. S; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.08-14, 2008.

GANGADHARAN, D; NAMPOOTHIRI, K. M; SIVARAMAKRISHNAN, S; PANDEY, A. Biochemical Characterization of Raw-starch-digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus Amyloliquefaciens*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, India, v.158, 653-662, 2009.

GYANESHWAR, P; NARESH KUMAR, G; PAREKH, L. J; POOLE, P. S. Role of Soil Microorganisms in Improving P Nutrition of Plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83–93, 2002.

GOLDSTEIN, A.H. Future Trends in Research on Microbial Phosphate Solubilization: Onehundredyears of Insolubility. In: VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (Ed.). **First International Meeting on Microbial Phosphate solubilization**. Springer: Dordrecht, 2007. P.91– 96.

GORDON ET AL; D. GORDON, C; ABAJIAN, P. Green Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research, Seattle**, n. 8, , p. 195–202, 1998.

GUPTA, R; BEG, Q. K; LORENZ, P. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v.599, n.1, p.15–32, 2002.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, India, v.38, n.11, p. 1599-1616, 2003.

HAMILTON, R; HIMMEL, M; KELLER, M; MCMILLAN, J. D; SHEEHAN, J; WYMAN, C. E. How Biotech Can Transform Biofuels. **Natural Biotechnology**, v. 26, p. 169-172, 2008.

HARUTA, S; CUI, Z; HUANG, Z; LI, M; ISHII, M; IGARASHI, Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. **Applied Microbiology Biotechnology**, China, v.59, p.529-534, 2002.

HINSINGER, P. Bioavailability of Soil Inorganic P in the Rhizosphere as Affected by Root-induced Chemical Changes: a review. **Plant Soil**, Netherlands, v.237, p.173–195, 2001.

ISHERWOOD, K. F. Mineral Fertilizer Use and the Environment. In: International Fertilizer Industry Association, United Nations Environment Programme, 2000, Paris.

ITOH, T; XIA, J; MAGAVI, R; NISHIHATA, T; RYTTING, J. H. Use of Snakeas a Model Membrane for in Vitro Percutaneous Penetration Studies: Comparison with Human Skin. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, out. 1990.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for Biotechnology. **Current Opinion Biotechnology**, Germany, v.13, n.4, p.390–397, 2002.

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

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Eds. N R Krieg and J G Holt. pp 235–256, 1984

JORQUERA, M. A; HERNANDEZ, M. T; RENGEL, Z; MARSCHNER, P; MORA, M. Isolation of Culturable Phosphobacteria with Both Phytatemineralization and Phosphate-solubilization Activity from the Rhizosphere of Plants Grown in a Volcanic Soil. **Biol Fertil Soils**, Chile, v.44, p.1025–1034, 2008.

KAMINI, N. R, FUJII, T, KUROSU, T, IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, Japan, v. 36, n.4, p. 317–324, 2000.

KÄMPFER, P. Taxonomy of Phosphate Solubilizing Bacteria. In: FIRST INTERNATIONAL MEETING ON MICROBIAL PHOSPHATE SOLUBILIZATION, 2002, **Springer**. p.101–106.

KHAN, M; ZAIDI, A; WANI, P. Role of Phosphate-solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture – a review. **Agron. Sustain. Dev.**, India, v.26, p.29–43, 2006.

KIM, S; HOLTZAPPLE, M.T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, Texas, V.97, n.4, p.583–591. 2006.

KOURIST, R; BRUNDIEK, H; BORNSCHEUER, U.T. Protein Engineering and Discovery of Lipases. **European Journal of Lipid Science Technonology**, Germany, v. 112, p.64.74, 2010.

KUMAR, C. G; TAKAGI, H. Microbial Alkaline Proteases: from a Bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, Japan, v.17, n.7, p.561–594, 1999.

LAEMMLI, V.L. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteria Phage T4. **Nature**, London, v. 227, p.680-5, 1970.

LEONEL, M; CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: glicose e álcool. In: FRANCO, C. et al. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 4, 224 p.

LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHIMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, p.593.

LIMA, M.L.F. **Caracterizações patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de Colletotrichum graminicola (Ces) G.W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, Zea mays L.** 2000. 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco.

LIN, E.S; WANG, C.C; SUNG, S.C. Cultivating Conditions Influence Lipase Production by the Edible Basidiomycete *Antrodia Cinnamomea* in Submerged Culture. **Enzyme Microb. Technol**, Taiwan, v.39, n.1, p.98–102, 2006.

LYNCH, J.P. Turner Review no.14. Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany*, Peen State, v.55, n.5, p.493–512, 2006.

LYND; et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, New York, v.66, n.3, p.506-577, 2002.

MANSFIELD, S.D; MEDER, R. Cellulose Hydrolysis – the Role of Monocomponent Cellulases in Crystalline Cellulose Degradation. **Cellulose**, Australia, v.10, p.159–169, 2003.

MARMUR, L. J. A producer for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**.v.3, p.208-218, 1961.

MAURER, K. H. Detergents Proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, n. 3, p. 330-334, 2004.

MOREIRA, F. M. S; PEREIRA, E. G. Microsymbionts: Rhizobia. In: SWIFT, M.; BIGNELL, D. (Ed.). **Standard Methods for Assessment of Soil Biodiversity and Land Use Practice**. Bogor, Indonesia, 2001. p.34.

MOREIRA, F. M. S; GILLIS, M; POT, B; KERSTERS, K; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic Applied Microbiology**, Rio de Janeiro V.16, n.1, p.135–146, 1993.

NAUTIYAL, C.S. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. **FEMSMicrobiol Lett**, India, v.170, p. 265–270, 1999.

NELSON, K. E; WEINEL, C; PAULSEN, I. T; DODSON, R. J; HILBERT, H; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, Germany, v.4, n.12, p.799-808, 2012.

OHTAKE, H; WU, H; IMAZU, K; AMBE, Y; KATO, J; KURODA, A. Bacterial Phosphonate Degradation, Phosphite Oxidation and Polyphosphate Accumulation. **Resources Conservation and Recycling**, Japan, v.18, n.1-4, p.125–34, 1996.

ODEE, D. W; SUTHERLAND, J. M; MAKATIANI, E. T; MCINROY, S.G; SPRENT, J.I. Phenotypic Characteristics and Composition of Rhizobia Associated with Woody Legumes Growing in Diverse Kenyan Conditions. **Plant and Soil**, v.188, p.65-75, 1997.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, A.C; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista saúde e biologia**, v.7,n.3, p.97-109, 2012.

PAIXAO, A. A. D. **Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel**. 2009. 59p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C. R; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**, New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. p.760.

PANDEY, A; NIGAM, P; SOCCOL, C. R; SOCCOL, V. T; SINGH, D; MOHAN, R. Advances in microbial enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, India,v. 31, p.135-152, 2000.

PASTEUR, N, PASTEUR, G, BONHOMME, P, CATALAN, J, BRITTON-DAVIDIAN, J, COBB, M. **Practical Isozyme Genetics**. Chinchester: Ellis Horwood, 1988. p.215.

PAZUR, J.H. Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch. In starch: Chemistry and Technology. V.1. Fundamental aspects (R. Whiatler and E. F. Paschall, Edds) p.133-175. Academic Press. New York. 1965.

PELCZAR, M. S; REID, R. D; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo; McGraw-Hill do Brasil, v.1, 1981.JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: HRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984. v.1, p.235- 256.

PEREIRA, M. R; MAESTER, T. C; ALVES, L. M. C; LEMOS, E. G. M. Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel. In: **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo, 2012, p.319-339.

QUAX, W. J. Bacterial enzymes. University of Groningen: The Netherlands, 2013. P 193-207.

RAO, M. B; TANKSALE, A. M; GHATGE, M. S; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, India, v.62, n.3, p.597–635, 1998.

READ, T. D; PETERSON, S. N; TOURASSE, N; BAILLIE, W. E. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. **Nature Publishing Group**, USA, v.423, p.81-86, 2003.

RODRIGUEZ, H; FRAGA, R; GONZALEZ, T; BASHAN, Y. Genetic of Phosphate Solubilization and its Potencial Applications for Improving Plant Growth-promoting Bacteria. **Plant Soil**, Mexico, v.287, p.15–21, 2006.

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R. Phosphate Solubilizing Bacteria and their Role in Plant Growth Promotion. **Biotechnology Advances**, Cuba, v.17, n.4-5, p.319–339, 1999.

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R; GONZALEZ, T; BASHAN, Y. Genetics of Phosphate Solubilization and its Potential Applications for Improving Plant Growth-promoting Bacteria. **Plant Soil**, Mexico, v.287, n.1-2, p.15–21, 2006.

ROTTING, A. et al. Fatty Acid Alkyl Esters: Perspectives for Production of Alternative Biofuels. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Germany, v.85, n.6, p.1713-33, 2005.

SANDGREN, M, STÅHLBERG, J.E; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SHARMA, R; SONI, S; VOHRA, R; GUPTA, L; GUPTA, J. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, India, v. 37, n. 10, p. 1075–1084, 2002.

SHARMA, A. D; NANDA, J. S; GILL, P. K; BHULLAR, S. S; SINGH, P; VYAS, D. Enhancement in inulinase production by mutagenesis in *Penicillium purpurogenum*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 270–274, 2002.

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

SHENOY, V.V.; KALAGUDI, G.M. Enhancing Plant Phosphorus Use Efficiency for Sustainable Cropping. **Biotechnology Advances**, India, v.23, n.7-8, p.501–513, 2005.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence on the contact between cells and fatty substrates. *Springer*, Madrid, v.23, n.1, p. 15-22, 1957.

SILVA FILHO, G. N; OLIVEIRA, V. L. *Microbiologia – manual de aulas práticas*. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p.155.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 116-124, 2008.

STRYER, L. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman. 1995

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.

SUMAN, S; RAMESH. K. Immobilization of a thermophilic extracellular amylase from thermophilic *Bacillus Species*. **Journal Pharmacological Sciences**, v.1, n.2, p. 315–319, 2009.

SUN, H; ZHAO, P; GE, X. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, China, v. 160, p. 988–1003, 2010.

TAKAHASHI, S; ANWAR, M. R. Wheat Grain Yield, Phosphorus Uptake and Soil Phosphorus Fraction after 23 Years of Annual Fertilizer Application to an Andosol. **Field Crops Research**, Japan, v.101, n.2, p.160–171, 2007.

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

TAO, G. C; TIAN, S. J; CAI, M. Y; XIE, G. H. Phosphate-solubilizing and Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. **Pedosphere**, v.18, p.515–523, 2008.

TEWARI, S.K.; DAS, B.; MEHROTRA, S. Cultivation of Medicinal Plants—Tool for biodiversity conservation and poverty alleviation in the Amatola region, South Africa. **Journal Rural Tech**, v.3,p.147–50, 2004.

TIMMIS, K.N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. **Environmental Microbiology**, v.4, n.12, p.779– 781,2002.

THOMA, J. A; SPRADLIN, J. E; DYGERT, S. Plant and animal amylases. In the enzymes (P.D Boyer. Ed) v.5, p.115-189. Academic Press, New York. 1971.

TRIPURA, C; SASHIDHAR, B; PODILE, A. R. Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis Enhanced Mineral Phosphate Solubilization by Groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Curr Microbiol* v.54, p.79–84, 2007.

VASSILEV,N; VASSILEVA, M. Biotechnological Solubilization of Rock Phosphate on Media Containing Agro Industrial Wastes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.61, p.435–440, 2003.

VAN DER VEEN, B. A; UITDEHAAG, J. C. M; DIJKSTRA, B. W; DIJKHUIZEN, L. Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VERGER, R. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts. *Trends Biotechnol*, France, v.15, n.1, p.32–38,1997.

VERMELHO, A. B; NORONHA, E. F; FERREIRA FILHO, E. X; FERRARA, M. A; BON, E. P. S. Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes. Rio de Janeiro, 2013. p. 214-235.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. (International Biological Programme Handbook, 15).

VITOLO, M. **Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). Biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 387-420.

WACKETT, L. P. Microbial consortia. *Environmental microbiology reports*, v.5, p.186-187, 2013.

WEISBURG, W. G., BARNES, M; PELLETIER, D. A; LANE, D. J. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal Bacteriology**, v.73, p. 697-703,1991.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme Biotechnology**. New York: John Wiley Sons, 1985.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n.2, p.221–271,1987.

WOOD, T. M. Properties and mode of action of cellulases. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 5, p. 111-137,1975.

WONGWILAIWARIN, S; RATTANACHOMSRI, U; LAOTHANACHAREON, T; EURWILAICHITR, L; IGARASHI, Y; CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme and Microbial Technology**, Thailand, v. 47, n.6, p.283–290, 2010.

WAKABAYASHI, H; TRIYANTO, T. Genotypic Diversity of Strains of Flavobacterium Columnare from Diseased Fish. **Journal of Fish Pathology**, v. 34, p. 65-71, 1999.

ZALDIVAR, J. et al. Fuel Ethanol Production from Lignocellulose: a Challenge for Metabolic Engineering and Process Integration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.56, p.17–34, 2001.

Zhi-Pei, L.; Wang, B.J.; Liu, S.J.; Liu, Y.H. *Asticcacaulis taihuensis* sp. Nov., a novel stalked bacterium isolated from Taihu Lake, China, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.1239-1242, 2005.

APÊNDICE

Meios de cultivo utilizados para a avaliação da produção de enzimas

A avaliação da produção de celulase foi realizada utilizando meio BHB contendo CMC. Após o cultivo a detecção da enzima celulase foi avaliada pela coloração das placas segundo (WOOD et al, 1982).

A produção de amilase foi realizada utilizando-se meio amido-ágar: K_2HPO_4 (0,3 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0 g/L); NaCl (0,5 g/L); $NaNO_3$ (1,0 g/L); Amido (10 g/L); pH 6,9. Após a placa ficar cinco dias em estufa tipo BOD, a placa foi corada com solução de iodo (0,1N) para a verificação da presença de halo.

A produção de protease utilizando-se meio YMA com leite: K_2HPO_4 (0,5 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g/L); NaCl (0,1 g/L); extrato de levedura (0,5 g/L), leite desnatado (10 mL); pH 7,0 (SOUZA et al., 2008).

As lipases foram avaliadas pelo cultivo dos isolados meio sólido contendo K_2HPO_4 (1,2 g/L); KH_2PO_4 (0,8 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L); extrato de levedura (0,5 g/L); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,02 g/L); azeite de oliva (10 g/L); ágar (12 g/L), Tween 20-10ml/L.

O teste de solubilização de fosfato foi realizado quanto à capacidade de solubilizar fosfato pelo meio sólido NBRIP (Glicose 20 g/L; $Ca_5(OH)(PO_4)_3$ 40 mL/L; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25g/L; KCl 0,2 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g/L; Ágar 10 g/L; pH 7,0) segundo NAUTYAL, 1999.