

Atividades celulolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios provenientes de solos amazônicos.

Peixoto J VO³, Minelli- Oliveira C², Brito L L², Oliveira L A¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia -INPA, Manaus -AM, ² PPG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas UFAM, Manaus, AM ³ Universidade Estadual do Amazonas UEA, Manaus, AM.

E-mail jpeixotovarsovia3@gmail.com, (luci_brito@hotmail.com, luizoli@inpa.gov.br
cassymminelli@hotmail.com.

Resumo

A associação rizóbios com leguminosa contribui para enriquecer o solo com nitrogênio por meio da fixação biológica. Entretanto, pouco se conhece a respeito do perfil enzimático desses microrganismos. Nesse contexto, a presente investigação propôs avaliar a produção de enzimas por isolados de rizóbios nativos da Amazônia. Essa triagem constitui o primeiro passo na seleção de micro-organismos nativos que são potencialmente exploráveis como produtores de enzimas. Foram testados 20 isolados nativos de rizóbios para as atividades celulolítica, proteolítica e ureolítica em meio YMA modificado. Dos 20 isolados de rizóbios da coleção do INPA testados, 15 se mostraram promissores nas atividades enzimáticas em meio contendo caseína como fonte de carbono, 10 em meio contendo celulose e 10 em meio contendo ureia. Foram observados isolados que atingiram crescimentos elevados nos meios com caseína e celulose até o 9º dia, mas foi observado que os rizóbios inoculados no meio de ureia necessitaram de 15 dias para que seu crescimento fosse completo.

Palavras-chave: Carboximetilcelulase, protease, urease

Introdução

Os micróbios são organismos muito pequenos que em geral podem ser visualizados com o uso de microscópio (Tortora *et al.*, 2012). Estes são de extrema importância ecológica na manutenção do equilíbrio do ambiente pela reciclagem dos elementos químicos entre o solo, os organismos e a atmosfera e são utilizados em aplicações comerciais e industriais para produzir alimentos, químicos, tratamento de detritos, controle de pragas e limpeza de poluentes.

Os micro-organismos têm um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas, o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (Jayani *et al.*, 2005). As enzimas de origem microbiana possuem

menor custo de produção do que as de origem animal e vegetal, podem ser produzidas em larga escala em fermentadores industriais e oferecem um amplo espectro de características físico-químicas.

A identificação de novas fontes microbianas é de grande interesse estratégico, pois garantem o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais. Os resíduos lignocelulósicos vêm sendo utilizados em processos biotecnológicos devido a aspectos econômicos, ambientais e à farta disponibilidade. Uma de suas aplicações é a produção de enzimas celulolíticas para a obtenção de açúcares fermentescíveis, utilizados na geração do bioetanol de segunda geração e servindo como fonte de energia renovável (Dashtban *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.* (2006), ao estudarem a capacidade de rizóbios nativos da Amazônia em produzir enzimas hidrolíticas, reportaram a atividade amilolítica como a mais frequente. Porém, não se pode negligenciar as potencialidades de uso dessas bactérias como fontes de outras enzimas de reconhecido valor industrial, caso das lipases, pectinases e proteases (Van Beilen, 2002; Kirk *et al.*, 2013). O presente estudo objetivou avaliar em meios de cultura solidificados, as atividades celulolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios nativos da Amazônia.

Material e Métodos

Obtenções das amostras

Foram testados 20 isolados de rizóbios obtidos da Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos do INPA.

Avaliações dos isolados capazes de usar caseína, celulose e ureia como fontes de carbono.

Para esta avaliação, foi usado o meio de cultura YMA (Vincent, 1970) modificado, onde se substituiu o manitol por carboximetilcelulose, caseína ou ureia como fontes de carbono. Foram feitas três repetições de cada meio para cada isolado.

A avaliação de crescimento foi feita pelo método de Oliveira e Magalhães (1999). Tal método leva a um processo de diluição do micro-organismo, onde a zona 1 é a de maior concentração e a zona 4, a mais diluída (Figura 1). De acordo com o crescimento de cada rizóbio, foram atribuídos valores variando de 1,00 (sem

crescimento visível na zona 1) a 4,00 (máximo crescimento na zona 4), podendo ter valores intermediários entre esses extremos (Figura 2 e Tabela 1). As placas foram mantidas em condições de laboratório com 28 ± 2 °C de temperatura. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até os 15 dias.

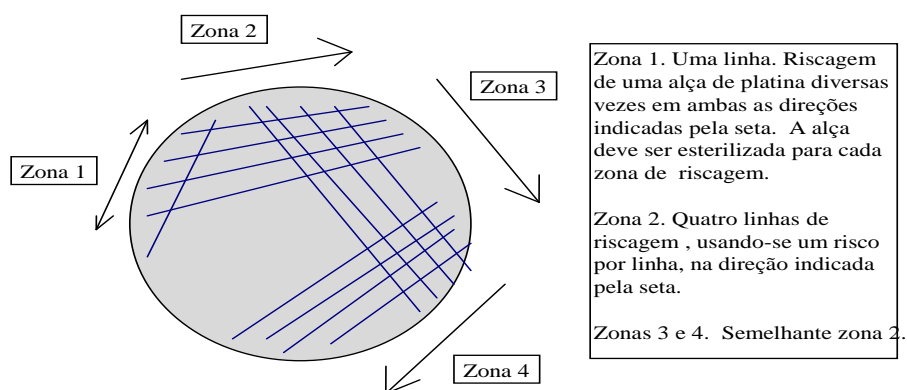


Figura 1. Método de avaliação do crescimento bacteriano segundo Oliveira e Magalhães (1999).

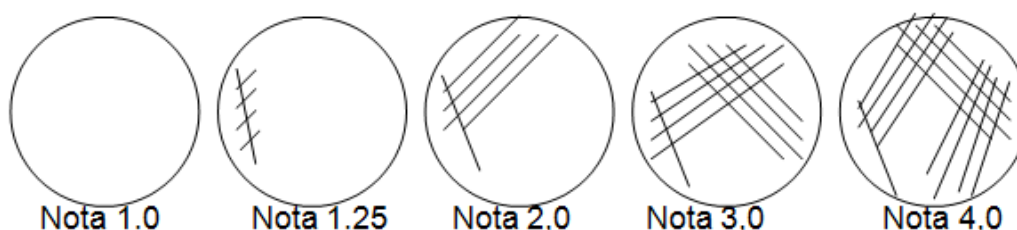


Figura 2. Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias segundo Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 1- Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias.

GRAU DE CRESCIMENTO	FAIXA DE PONTUAÇÃO
Baixo	1,00 – 2,00
Médio	2,06* - 3,00
Alto	3,06** - 4,00

* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25. ** Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25 (Oliveira e Magalhães, 1999).

Avaliações do potencial de degradação de caseína, celulose e ureia.

Atividade proteolítica

A habilidade das bactérias em hidrolisar proteínas foi testada em meio YMA modificado contendo 10 g de caseína como substituto do manitol como fonte de carbono em pH 5,5.

Atividade celulolítica

A produção de celulase foi detectada, adicionando-se ao meio YMA modificado, 10g de carboximetilcelulose em substituição ao manitol, com pH 5,5. Avaliou-se a atividade por sete dias a 28° C.

Atividade ureolítica

A atividade ureolítica foi avaliada pela metodologia proposta por Christensen (1946), modificada com substituição da solução de ureia a 40% por 20g/L de ureia. Além da ureia, a composição do meio em g/L foi: 1,0g de glicose, 1,0 de peptona, 15gde agar em pH 6,8. A atividade dos micro-organismos produtores de urease foi constatada após quinze dias de incubação.

Resultados de Discussão

Avaliações dos isolados de rizóbios

Os rizóbios apresentam alta diversidade genética e conseguem se adaptar a diferentes condições de solos, podendo se desenvolver nas rizosferas de leguminosas, onde induzem a formação de nódulos, como também, nos de não leguminosas ou leguminosas não compatíveis, onde, apesar de não induzirem nodulação, conseguem se multiplicar em grandes números. Na ausência de plantas na área de solo, podem apresentar habilidade saprofítica elevada, usando matéria orgânica como fonte de carbono (Zilli *et al.*, 2013).

A Tabela 2 mostra os melhores isolados quanto ao crescimento em meio de cultura contendo carboximetilcelulose em decorrência da atividade celulolítica, que apresentaram pontuações superiores a 3,0 até o nono dia de crescimento. Desses, os que

apresentaram melhores crescimentos foram os identificados como INPA R577, R549, R547, R562, R561, R955 e R618, por já apresentarem máximo crescimento (pontuação de 4,0) já na primeira avaliação, aos 3 dias. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), os que crescem mais rápidos são os que adaptam ao meio de cultura testado.

Tabela 2. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo carboximetilcelulose como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (INPA)	Dia de incubação				
	3	6	9	12	15
R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R549	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R562	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R561	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R615	1,50	3,06	4,00	4,00	4,00
R556	1,50	1,00	2,50	3,00	4,00
R955	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Com relação aos rizóbios produtores de proteases (Tabela 3), também observou-se que dos 20 testados, 15 mostraram crescimentos elevados como indicativo da produção dessa enzima. Todos, exceto o isolado INPA R577, cresceram aos 3 dias de incubação, mostrando que nesse meio de cultura é ótimo para esses rizóbios.

Tabela 3. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo caseína como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (INPA)	Dias de incubação				
	3	6	9	12	15
R577	1,0	2,5	3,0	4,0	4,0
R955	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R942	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R957	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R954	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R620	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R605	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R598	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R612	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R586	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R558	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R618	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Quanto á atividade ureolítica, 10 dos 20 isolados mostraram-se superiores aos demais (Tabela 4). Desses, o melhor foi o isolado INPA R553 que apresentou crescimento máximo já aos 3 dias de incubação.

Tabela 4. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo ureia como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (CMINPA)	Dias de incubação				
	3	6	9	12	15
R610	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R592	1,5	2,5	3,0	4,0	4,0
R581	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R942	0,5	1,0	2,5	3,0	4,0
R958	0,0	0,5	1,0	2,5	3,0
R548	0,0	0,5	1,5	3,0	4,0
R593	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R553	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R606	0,0	0,5	1,0	2,5	3,0

Conclusões

Dos 20 isolados de rizóbios da coleção do INPA testados, 10 mostraram-se promissores como produtores de celulasas, 15 como produtores de proteases e 10 como produtores de ureases.

Os rizóbios inoculados no meio com ureia necessitaram de 15 dias para completar o crescimento.

Este estudo revelou alguns isolados de rizóbios nativos da Amazônia como fontes promissoras de enzimas de importância industrial para uso biotecnológico.

Agradecimentos

Agências de Fomento: CNPq e FAPEAM pelo apoio financeiro e bolsas.

Referências

Christensen WB (1946) Urea decomposition as means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *J. Bact.*, 52:461-466.

Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W (2010) Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Review in Biotechnology*, 30(4):302-309.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytical enzymes: a review. *Process Biochem.*, 40:2931– 2944.

Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):345-351.

Oliveira LA, Magalhães HP (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Oliveira NA, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Júnior AF (2006) Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26:853-860.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012) *Microbiologia*. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al. Revisão: Flávio Guimarães da Fonseca. 10 ed. Porto Alegre; Atmed.

Van Beilen JB (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4):338-344.

Vincent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p.

Zilli JÉ, Pereira GMD, França JI, Silva K, Hungria M, Rouws JRC (2013). Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*, 43:153-160. DOI: 10.1590/ S0044-59672013000200004