

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

THIAGO HENRIQUE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO RIACHO CAVOUÇO PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

**RECIFE
2016**

THIAGO HENRIQUE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO RIACHO CAVOUÇO PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientadoras: Prof^a.Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Prof^a.Dra. Leonor Alves de Oliveira

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Thiago Henrique da

Seleção de bactérias isoladas do riacho Cavouco para produção de enzimas hidrolíticas/ Thiago Henrique da Silva– Recife: O Autor, 2016.

66 folhas: Il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadoras: Maria Betânia Melo de Oliveira e Leonor Alves de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências

- 1. Bactérias- identificação 2. Enzimas 3. Biotecnologia I. Silva, Márcia Vanusa da (orientadora) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorientadora) III. Oliveira, Leonor Alves de (coorientadora) IV. Título**

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-222

THIAGO HENRIQUE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO RIACHO CAVOUÇO PARA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 24/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 24 de Fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: em especial a minha esposa **Tamires Pereira**, e a minha mãe **Suely Gertrudes**, é um prazer partilhar essa vitória com vocês. Não conquistaria nada se não estivessem ao meu lado. Obrigado, por estarem sempre presentes em todos os momentos, me dando carinho, incentivo, determinação, fé, e principalmente o Amor de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha esposa Tamires Pereira ofereço um agradecimento mais que especial, por ter me apoiado nos momentos difíceis, ter me proporcionado carinho, respeito, e por tornar minha vida cada dia mais feliz.

Aos meus Pais, em especial minha Mãe Suely Gertrudes, que me deu toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Pela confiança e pelo amor que me fortalece todos os dias.

A minha orientadora Dra. Márcia Vanusa da Silva, as minhas co-orientadoras Dra. Maria Betânia, e Dra. Leonor Alves pelo suporte, pelas orientações e incentivos, e que Deus abençoe vocês.

Ao meu parceiro de laboratório e primo Rubens Lorena, pelo grande apoio e dedicação.

Aos meus amigos Thiago David e Uiara Maria, agradeço muito pelo incentivo, companheirismo, e exemplo de profissionalismo.

A Professora Norma pelo exemplo de profissionalismo e liderança.

Aos meus amigos de Pós-graduação: Karine, Júnior, Wellington, Iranildo, Fernanda, Natali. Pessoas muito especiais, pois compartilharam comigo os seus conhecimentos.

A todos meus amigos do laboratório LAMAI, agradeço por tudo, em especial: Welma, Pérsio, Iasmin, Vânia, Erik, Robson, Nelânia, e Camila.

A colega Samiris, obrigado pelo apoio.

Ao Departamento de Biotecnologia Industrial, nas pessoas do Professor Will, e Klayton. Também ao departamento de Bioquímica da UFPE, pelo grande apoio.

Agradeço a meus familiares, pelo apoio. À todos os meus professores, futuros colegas, aqueles acima de tudo, por terem se tornado grandes amigos, fizeram com que eu continuasse e chegasse até onde cheguei.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, porém poucos trabalhos foram realizados para o conhecimento da biodiversidade microbiana em ambientes aquáticos impactados. O riacho Cavouco faz parte do patrimônio ambiental e histórico da UFPE, assim é importante que sejam realizados estudos que visem propor medidas para o resgate do seu bioma. Esse estudo identificou a produção de enzimas celulase, xilanase, amilase, protease, lipase, e l-asparaginase na comunidade microbiana desse riacho obtida em cinco pontos estratégicos do seu percurso no *Campus-Recife* da UFPE. As bactérias foram previamente identificadas fenotípica e molecularmente. Foram utilizadas espécies pertencentes aos gêneros: *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus hominis* e *Proteus*. Verificou-se que as bactérias do riacho Cavouco apresentaram importância do ponto de vista biotecnológico, pois 71% das espécies investigadas produziram enzimas l-asparaginólíticas, 43% enzimas proteolíticas, 36% lipolíticas, 29% celulolíticas, 21% amilolíticas e apenas 10% xilanolíticas. Houve variabilidade na produção de enzimas por espécies provenientes de um mesmo ponto, indicando desta forma divergência populacional. Na análise quantitativa foi verificado uma maior expressão das enzimas l-asparaginase e lipase. Esses resultados demonstram o potencial biotecnológico das enzimas investigadas tanto para o setor industrial quanto clínico.

Palavras-chave: Diversidade. Bactérias. Enzimas. Riacho Cavouco.

ABSTRACT

The genetic diversity and metabolic microorganisms has been explored for many years in order to obtain biotechnological products, but few studies have been conducted to the knowledge of microbial biodiversity in aquatic environments impacted. The creek Cavouco part of the environmental and historical heritage of the UFPE, so it is important that studies aimed at proposing measures to the rescue of their biome. This study identified the production of cellulase enzymes, xylanase, amylase, protease, lipase, and L-asparaginase in the microbial community that stream obtained in five strategic points of its course at the Campus-Reef UFPE. Bacteria were previously identified phenotypically and molecularly. 11 species belonging to the genera were used: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus hominis*, *Proteus mirabilis*. It was found that Cavouco stream bacteria have important biotechnological point of view, since 71% of produced L-asparaginolíticas enzymes, 43% proteolytic enzymes, 36% lipolytic, 29% cellulolytic 21% amylolytic and only 10% xylan-degrading. There was variability in the production of enzymes by species from the same point thus indicating population divergence. The quantitative analysis has been further expression of L-asparaginase enzymes and lipase. These results demonstrate the potential of biotechnology enzymes investigated for industrial and clinical field.

Key-words: Diversity. Bacteria. Enzymes. Cavouco Stream.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Riacho Cavouco dentro do Campus – Recife da UFPE, 2016	16
Figura 2 - Riacho Cavouco dentro do Campus – Recife da UFPE, 2016	17
Figura 3 - Percurso do riacho Cavouco no campus Recife da UFPE	32
Figura 4 - Percentual das enzimas hidrolíticas em amostras de isolados do riacho Cavouco.....	41
Figura 5 - Placas de Petri com os melhores resultados qualitativos para os isolados	42
Figura 6 - Atividade dos isolados para a celulase em U/mL	48
Figura 7 - Atividade em U/mL dos isolados para a xilanase.	50
Figura 8 - Dosagem de Protease em U / mL em diferentes microrganismos	52
Figura 9 - Dosagem de Lipase U/MI em diferentes microrganismos	52
Figura 10 - Atividade dos isolados para a l-asparaginase em U/mL.	53
Figura 11 - Dosagem de Bradford para a celulase	54
Figura 12 - Dosagem de proteínas de Bradford para a xilanase	55
Figura 13 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de amilase	55
Figura 14 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de protease	56
Figura 15 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de lipase	56
Figura 16 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de l-asparaginase	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de enzimas hidrolíticas em bactérias isoladas do Riacho Cavouco	45
Tabela 2 - Produção de celulase, protease e xilanase, com as medições dos halos em bactérias isoladas do Riacho Cavouco	46
Tabela 3 - Produção de lipase, amilase e l-asparaginase, com as medições dos halos em bactérias isoladas do Riacho Cavouco	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
CMC	Carboximetilcelulose
LIKA	Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami
NuBIOMA	Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da UFPE
PCU	Prefeitura da Cidade Universitária
SDS	Dodecilsulfato de sódio
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
DNS	Ácido dinitrosalicílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Geral.....	15
2.2	Específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	O riacho Cavouco como campo de pesquisas	16
3.2	Caracterização da microbiota do riacho Cavouco	18
3.2.1	Bactérias gram-negativas isoladas no riacho Cavouco.....	19
3.2.2	Bactérias gram-positivas isoladas no riacho Cavouco.....	22
3.3	Importância da avaliação de enzimas microbianas.....	24
3.3.1	Enzimas hidrolíticas e suas características.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Procedência dos isolados.....	31
4.2	Reativação das Bactérias.....	33
4.3	Determinação enzimática qualitativa: métodos analíticos e condições experimentais.....	33
4.3.1	Determinação das enzimas celulolíticas.....	33
4.3.2	Determinação das enzimas xilanolíticas.....	33
4.3.3	Determinação das enzimas amilolíticas.....	33
4.3.4	Determinação das enzimas proteolíticas.....	33
4.3.5	Determinação das enzimas lipolíticas.....	34
4.3.6	Determinação das enzimas L-asparaginolíticas.....	34
4.4	Detecção dos Halos em meio sólido.....	36
4.5	Fermentação e atividade enzimática dos isolados.....	35
4.6	Quantificação da atividade enzimática.....	37

4.7	Determinação de proteínas pelo método de Bradford.....	39
4.8	Análises estatísticas	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes impactados urbanos se originam a partir das mudanças nos padrões produtivos e nas dinâmicas populacionais, alterando drasticamente a natureza. Um crescimento expressivo da população mundial em razão de uma maior abundância de recursos é responsável pela diminuição progressiva da capacidade de resiliência dos ecossistemas (SILVA; TRAVASSOS, 2008).

Essas alterações decorrem principalmente de processos de poluição que afetam, sobretudo, a composição dos riachos provocando, em alguns casos, aumento significativo das bactérias patogênicas (CARVALHO, *et al.*, 2015). Entretanto, nos últimos anos, vem se buscando alternativas para combater a poluição ambiental motivado por pesquisas por microrganismos que aliem capacidade industrial e ausência de patogenicidade (MARTINS; MARTINS, 2012).

A importância do estudo da microbiota de ambientes impactados é importante, pois determina o grau de colonização e verifica a capacidade de adaptação desses microrganismos. Esses estudos também podem verificar a produção de enzimas e definir sua influência no ecossistema, bem como avaliar seu potencial biotecnológico (KEHINDE, *et al.* 2008).

O riacho Cavouco localizado nas coordenadas 8°2'52.05" latitude Sul e 34°57'10.33" longitude Oeste, possui sua nascente na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). No trecho que percorre dentro da Universidade, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa, resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. Estudos recentes comprovam o efeito cumulativo desses resíduos provocado por mudanças na dinâmica desse ecossistema, afetando a qualidade da água, a macro e micro fauna e flora existentes (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013).

Diferentes ações vêm sendo realizadas pelo grupo Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente (NuBIOMA) da UFPE em parceria com a Prefeitura da Cidade Universitária (PCU) na tentativa de monitorar o impacto ambiental causado nesse ecossistema e resgatar a qualidade da água e vida desse riacho. Dentre essas ações destaca-se a Caracterização Fenotípica da Microbiota do Cavouco. Esse projeto,

previamente foi realizado pelo grupo NuBIOMA, identificou diferentes gêneros bacterianos Gram negativos e Gram positivos nesse ambiente.

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiológica, sendo esta última, a fonte mais recorrida na obtenção de enzimas para aplicação biotecnológica por terem menores custos na sua obtenção, além da possibilidade de produção em larga escala.

Sendo assim, a ampla diversidade quanto às características enzimáticas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, buscando novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor através da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar qualitativa e quantitativamente o perfil enzimático de bactérias isoladas do riacho Cavouco e verificar sua importância biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial das bactérias na produção de enzimas amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas, proteolíticas, lipolíticas e L-asparaginolíticas provenientes do riacho Cavouco.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o potencial qualitativo das bactérias isoladas no riacho Cavouco quanto a produção das enzimas: amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas, proteolíticas, lipolíticas e L-asparaginolíticas.

Investigar quantitativamente os perfis enzimáticos dos isolados.

Comparar o potencial de produção das enzimas hidrolíticas entre os diferentes isolados bacterianos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O riacho Cavouco como campo de pesquisas

O riacho Cavouco faz parte do patrimônio ambiental e histórico da UFPE, assim é importante que sejam realizados estudos que visem propor medidas para o resgate do seu bioma. Esse ambiente faz parte do domínio da antiga Várzea do Capibaribe, com sua nascente no *Campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Este riacho tem cerca de 6.000 metros de extensão e largura variável entre 2 a 15m, desagua em um dos principais rios do estado de Pernambuco o rio Capibaribe, do qual é um afluente de sua margem direita (ESPINDULA; SANTOS, 2004).

Em seu trajeto, o riacho Cavouco, que se encontra canalizado em grande parte de seu curso, parte de sua nascente localizado ao lado do colégio de Aplicação da UFPE e percorre algumas ruas do bairro da Várzea que, por serem desprovidas de esgotamento sanitário, utilizam o mesmo como corpo receptor de seus efluentes. Ao retornar ao *Campus* da UFPE pela Av. Acadêmico Hélio Ramos, recebe o descarte de efluentes hospitalares e substâncias químicas, em sua grande maioria sem tratamento prévio, oriundas dos Centros de pesquisa da própria Universidade (figura 1). Deixando novamente o *Campus* da UFPE, o Cavouco percorre os bairros do Engenho do Meio, Iputinga e Monsenhor Fabricio, os quais são áreas densamente urbanizadas, continuando, em geral, como corpo receptor dos esgotos gerados nessas áreas, até o seu destino final (CALADO et. al., 2002).

Figura 1 - riacho Cavouco dentro do *Campus* – Recife da UFPE, 2016.



Fonte: O Autor (2016).

Figura 2 - Riacho Cavouco no *Campus* – Recife da UFPE, 2016.



Fonte: O Autor (2016).

Assis e colaboradores (2014) fizeram um estudo para avaliar a capacidade de potenciais biomarcadores enzimáticos presentes em tecidos da espécie *Oreochromis niloticus* obtida do riacho Cavouco, *Campus* Recife da UFPE. A presença de agentes anticolinesterásicos nas águas desse riacho demonstrou a atividade específica da AChE, nas amostras de cérebro de tilápias provenientes desse riacho, frente as amostras-controle de um ambiente isento de contaminação. Nessa pesquisa, os autores constataram uma diminuição de até 46,66% das atividades enzimáticas. Todas as enzimas (Tripsina, quimiotripsina, protease, acetilcolinesterase) investigadas foram afetadas negativamente pelo ambiente do riacho Cavouco, quando comparadas as atividades da população-controle. De acordo com os resultados e com as condições experimentais, as colinesterases, principalmente a BChE hepática, apresentaram alta sensibilidade a carga poluente, evidenciando a presença de agentes anticolinesterásicos no ambiente em questão sendo, portanto, considerada um excelente biomarcador. Paralelamente, constituindo-se um candidato a utilização como biomarcador, está a amilase, cuja alteração da atividade reflete principalmente a poluição orgânica por inibidores de origem vegetal e microbiana.

Freitas (2015) verificou o potencial da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (Wsmol) para tratamento de água contaminada, utilizando como material do seu

estudo água isolada de cinco pontos estratégicos do riacho Cavouco. Nesse trabalho foi verificado que a WSMoL é capaz de promover remoção de íons metálicos na água proveniente do riacho Cavouco (ambiente impactado), entretanto, a exposição aos metais levou à perda de atividade antibacteriana da lectina. Ademais, o autor demonstrou que a utilização de WSMoL em conjunto com sulfato de alumínio é um método eficiente para promover forte redução da turbidez e ecotoxicidade na água do ambiente investigado, sem resultar em uma elevada concentração residual de alumínio.

3.2 Caracterização da microbiota do riacho Cavouco

Os poluentes aquáticos mais frequentes são os patógenos, os resíduos orgânicos, os sedimentos, nutrientes e os poluentes químicos. Tais poluentes podem se espalhar pela superfície e/ou pela coluna d'água formando "soluções", que podem resultar em efeitos indesejáveis ao ecossistema (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Além do ambiente, outro setor que é atingido diretamente pelo ambiente aquático contaminado é a saúde pública. Em 2003 a Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou que cerca de 80% das doenças que ocorrem em países em desenvolvimento são veiculadas pela água contaminada por microrganismos patogênicos. Essas doenças verificadas através de Estudos epidemiológicos demonstraram as infecções gastrointestinais, respiratórias e mortes associadas à inalação, ingestão ou ao contato com água contaminada com organismos patogênicos (CARVALHO, 2015).

Sendo assim, as análises microbiológicas tornou-se uma importante ferramenta nos monitoramentos de ecossistemas aquáticos. Tais parâmetros possibilitam o enquadramento da água em classes conforme suas condições de uso segundo a resolução nº 357 de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Em estudos prévios o grupo NuBIOMA realizou a identificação de isolados bacterianos Gram positivos e Gram negativos do riacho Cavouco (PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, 2015). Os resultados possibilitaram não apenas a caracterização microbiota daquele ambiente, mas também a criação de um banco de dados referente as características fisiológicas e metabólicas desses isolados o que poderá auxiliar na interpretação da evolução da qualidade ambiental do riacho Cavouco ao longo do tempo.

3.2.1 Bactérias gram-negativas isoladas no riacho Cavouco

Escherichia coli

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é um dos habitantes mais comuns do trato intestinal humano e provavelmente o organismo mais conhecido da microbiologia. Relembre de capítulos anteriores que muito se sabe sobre a bioquímica e a genética da *E. coli*, que continua sendo uma importante ferramenta para a pesquisa biológica básica – muitos pesquisadores a consideram um animal de laboratório. Sua presença na água e nos alimentos é uma indicação de contaminação fecal. *E. coli* não é um patógeno comum; contudo, ela pode ser a causa de infecções do trato urinário, e algumas produzem enterotoxinas que causam a diarreia do viajante e ocasionalmente doença de origem alimentar grave (TORTORA, 2012).

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, predominante na microbiota normal do intestino humano e em outras espécies animais. As cepas desta bactéria estão envolvidas com infecções intestinais foram denominadas *E. coli* diarreiogênicas. Embora apresentem prevalências mais baixas que a *E. coli* em crianças menores de cinco anos, bactérias do gênero *Shigella* e *Salmonella* são importantes patógenos associados à diarreia, sobretudo quando as fezes são disentéricas (FAGUNDES, et. al., 1996).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais microrganismos que é proveniente de efluentes hospitalares. É um tipo patógeno nosocomial freqüente, sendo responsável por infecções em várias partes do corpo humano, especificamente em pacientes imunocomprometidos. Está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos (GALES, et. al., 2001). Esta bactéria produz uma grande variedade de fatores de virulência, por conseguinte, a patogênese desta bactéria podem ser descritos como multifatorial (ROCA, 2014).

Pseudomonas putida

Pseudomonas putida é um bacilo gram negativo, isolável aeróbico tanto a solo e em água ou amostra clínica, e às vezes se comporta como patógeno oportunista (GOENAGA, *et. al.*, 2005). Esta bactéria gram-negativa, aeróbica que mostra grande versatilidade metabólica. Devido à sua capacidade de metabolizar a uma vasta gama de compostos biogênicos e xenobióticos, os membros desta espécie são capazes de colonizar vários nichos, incluindo solo, água doce, e as superfícies de organismos vivos (TIMMIS *et. al.*, 2002).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da família *Enterobacteriaceae*, capaz de sobreviver em objetos inanimados ou fômites, em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais e pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, colonizar o corpo humano e causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos (CORREA, *et. al.*, 2013). Dentre as bactérias a *Klebsiella pneumoniae* tem como mecanismo de resistência a produção de betalactamases contrapondo os antimicrobianos betalactâmicos. As betalactamases são enzimas que promovem a degradação do anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo que ele apresente atividade (ALVES; BEHAR, 2013). Pesquisas feitas por infectologistas registram que a maioria das infecções associadas à enterobactéria produtora da enzima KPC ocorre em pacientes imunodeprimidos hospitalizados e/ou com dispositivos invasivos como cateter, sonda, punção venosa periférica ou em outra situação que possa favorecer a infecção bacteriana (MARCHAIM, *et al.*, 2008).

Stenotrophomonas maltophilia

Stenotrophomonas maltophilia caracteriza-se por ser um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, aeróbio, com distribuição ubíqua e baixa virulência. Sendo considerado um agente incomum de infecções em indivíduos

imunocompetente, previamente denominada *Pseudomonas maltophilia* e posteriormente *Xanthomonas maltophilia*, é atualmente a única espécie pertencente ao gênero *Stenotrophomonas* (CORZO-DELGADO; GOMEZ-MATEOS, 2006; JULIET; FERNANDEZ, 2006).

Em infecções ocorridas por *Stenotrophomonas maltophilia* os fatores de risco incluem uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro, carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro estendido e fluoroquinolonas, imunossupressão, leucemias ou linfomas refratários, neutropenia pós-quimioterapia (DI BONAVENTURA, 2007). Esta bactéria pode ser encontrada em uma grande variedade de ambientes e regiões geográficas, ocupando nichos ecológicos distintos e fontes múltiplas de água tais como rios, poços, lagos de reservatórios municipais e até água utilizada na indústria farmacêutica. Outras fontes de isolamento incluem o solo, detritos, leite cru, peixe congelado, ovos e carcaça de animais. No ambiente hospitalar, essa espécie já foi isolada de água de torneira, pias, respiradores, cateteres de sucção, monitores de pressão arterial, equipamento de diálise, máquina produtora de gelo, soluções desinfetantes e, ocasionalmente, das mãos de profissionais de saúde (BIELANSKI, et al. 2003).

Serratia liquefaciens

Serratia liquefaciens faz parte da família *Enterobacteriaceae* que podem ser implicadas em várias doenças infecciosas e podem ser isoladas de qualquer amostra recebida em laboratório clínico. A produção de enzimas lipases, gelatinase e Dnase por espécies de *Serratia* são importantes fatores de sua patogenicidade. A resistência à colistina e à cefalotina é uma característica diferencial adicional (KONEMAN, et. al., 2001). A alta resistência a muitos antibióticos utilizados na atualidade *reconhece a Serratia* como um patógeno importante, com propriedades invasivas. Em determinada ocasião, essa bactéria foi utilizada como comensal inócuo para detectar contaminação, a princípio devido à característica pigmentação vermelha de algumas cepas, de fácil detecção em meios de cultura (MURRAY, et. al., 1999).

Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae pode causar infecções do trato urinário e infecções hospitalares, essa bactéria é amplamente distribuída em humanos e animais, assim como na água, no esgoto e no solo (TORTORA, 2012). Também são observadas infecções em vítimas de queimaduras, doentes imunocomprometidos e doentes com doença maligna, o trato urinário e pulmonar são os sistemas de órgãos mais comumente colonizados nestes pacientes. *E. cloacae* causa bacteremia dependendo da extensão da imunossupressão. Focos de infecção são gravados em um número de ambientes hospitalares, casos esporádicos de *E. cloacae* têm sido associados a uma mistura de fluidos corporais contaminados da via intravenosa, também se pode encontrar essa bactéria em soluções de nutrição parenteral, alimentação enteral, fórmula infantil, solução cardioplégica, e produtos sanguíneos. De uma forma geral a *E. cloacae*, é um oportunista patogénico emergente que está associado com infecções nosocomial (MUSIL, *et. al.*, 2010).

Proteus mirabilis

São bactérias gram-negativas com motilidade à temperatura de 36 ° C, podem ser cultivadas tanto em condição, aeróbia e anaeróbia, com o tipo de metabolismo de fermentação. Uma das principais propriedades das estirpes de *Proteus spp.* é o dimorfismo - dependendo das condições ambientais atuais exibem alterações fisiológicas e morfológicas (JONES et al, 2007). *Proteus spp.* são típicos patógenos oportunistas, relativamente infeccioso e contribui para as infecções principalmente em pacientes imunocomprometidos. Estas infecções são normalmente a longo prazo e difícil de curar (DRZEWIECKA; SIDORCZYK, 2005). Warren et. al. (1996) descreveram que *P. mirabilis* é considerado a terceira causa de infecção urinária complicada, após *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, correspondendo a 12% dos processos infecciosos; já em bacteriúria por cateter de longa permanência, é o segundo agente mais frequente após *Escherichia coli*, ocorrendo em 15% dos casos. Esses dados são confirmados por trabalhos publicados mais recentemente.

Segundo Kozalski et al. (1997), microrganismos desse gênero *Proteus* são comumente encontrados no meio ambiente, principalmente em locais com água

poluída e solos com material degradado, participando da decomposição de matéria animal, já que esses bacilos exibem atividades proteolíticas em condições de aerobiose e são anaeróbios facultativos. A deaminação oxidativa dos aminoácidos e a habilidade em hidrolisar uréia em amônia e dióxido de carbono são as propriedades bioquímicas de maior representatividade dessa bactéria.

3.2.2 Bactérias gram-positivas isoladas no riacho Cavouco *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas e podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. São resistentes ao calor e a outros agentes destrutivos (STANIER, 1969). Podem oxidar uma ampla faixa de compostos orgânicos e alguns casos são fermentativas. A maioria delas tem exigências nutricionais simples, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas B como fatores de crescimento. Formam endósporos, característica que as coloca entre os esporulados, e apresentam a habilidade de produzir antibiótico (FREITAS; PIZZINATTO, 1997). A formação de endósporos aumenta a resistência aos fatores adversos. Dessa forma, podem ser armazenados, como inoculantes, por um período mais longo, e possuem maior tempo de permanência no solo, além da facilidade de aplicação.

Bacillus pumilus

Essa espécie é considerada gram-positivo, aeróbica, em forma de bastonete, formadores de endósporos que podem ser isolados a partir de uma ampla variedade de solos, plantas e superfícies ambientais (BENARDINI, et al., 2003).

Bacillus cereus

O *Bacillus cereus* é uma bactéria aeróbia facultativa, formadora de esporos, comumente encontrada em solos, vegetais e em vários alimentos processados e crus. Este microrganismo é capaz de produzir toxinas, incluindo enterotoxinas, uma potente toxina emética, fosfolipases, proteases e hemolisinas. Esta espécie está entre as predominantes em surtos de intoxicação alimentar, causando diarreia e vômito sendo

estas alterações atribuídas à ação das enterotoxinas e de uma potente toxina emética (FINLAY, et al, 2002).

Bacillus licheniformis

As colônias do *B. licheniformis* possuem um aspecto de líquen. Elas são secas e aderentes a superfície do ágar. Está implicado em casos de toxinfecções alimentares após a ingestão de carne cozida ou vegetal. O período de incubação é aproximadamente 8 horas e o principal sinal da doença são vômitos que em 50% dos casos são acompanhados de diarreia (AIZAWA, et al., 2010).

Staphylococcus hominis

Faz parte da flora bacteriana normal da pele humana e por esse motivo muitas vezes são fonte de contaminação para isolados clínicos, no entanto cada vez mais têm sido isolados a partir de infecções. *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis* são coagulase negativos mais comuns nas superfícies das axilas, braços e pernas. *S. hominis* parece ser mais bem sucedido em colonizar regiões mais secas da pele (GAO, 2007).

3.3 Importância da avaliação de enzimas microbianas

As enzimas são catalisadores biológicos, normalmente de natureza proteica, que participam de muitas reações bioquímicas, tendo como principal função o controle metabólico. Essas moléculas são bastante específicas e apresentam variados usos e funções. Elas têm sido utilizadas pelo homem desde os tempos mais antigos, hoje oferecem as mais diversas aplicações na indústria biotecnológica, pois comparadas aos catalisadores químicos, apresentam benefícios como alta especificidade, condições suaves de reação e redução de problemas ambientais e toxicológicos (COELHO; NASCIMENTO, 2008).

A matéria orgânica presente no solo é mineralizada pela ação catalítica de diferentes enzimas, produzidas na sua maioria pelos microrganismos presentes nesse

ambiente. Considerando que inúmeros fatores de natureza biológica ou físico-química podem influenciar no número e atividade enzimática de bactérias e fungos amilolíticos, celulolíticos, proteolíticos e ureolíticos. Estudos realizados com microrganismos produtores de hidrolases, verificou-se que tanto a frequência quanto a atividade enzimática das bactérias foram maiores que dos fungos. Os isolados bacterianos também apresentaram múltiplas atividades enzimáticas, sendo a celulolítica, e proteolítica as mais evidentes (SANOMIYA; NAHAS, 2003).

As hidrolases são enzimas em que a água participa na clivagem de ligações covalentes do substrato. A intolerância a lactose nos seres humanos é causada pela carência de lactase, que cliva a lactose em galactose e glicose. Em relação ao mercado, o número de enzimas identificadas e integrantes da lista da Comissão Internacional de Enzimas é de cerca de 3.000, contudo somente um pequeno número destas enzimas, cerca de 60, tem aplicação industrial e é utilizado em quantidades apreciáveis. Devido aos altos custos, principalmente na indústria de alimentos, o mercado mundial de enzimas está limitado a um volume relativamente pequeno (COELHO, et. al., 2008).

As enzimas mais utilizadas nos processos industriais são as hidrolases ou enzimas hidrolíticas, que catalisam a quebra de grandes biopolímeros em pequenas unidades. São altamente utilizadas pelas indústrias têxteis, de detergentes, alimentícia, de papel e de couro. Dentre as hidrolases mais importantes estão às amilases, proteases, xilanases e celulases, empregadas amplamente nas mais diversas indústrias (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Bastos em 2005, foi verificado a produção extracelular de enzimas a partir do fungo *Crinipellis pernicioso* isolados do cacauzeiro e do cupuaçuzeiro. Constatou-se que *C. pernicioso* tem a capacidade de utilizar celulose, amido e lipídios como fontes de energia. Também, admite-se que, durante o período de incubação no hospedeiro o fungo libera amilases, celulases, proteases e oxidases que ativamente degradam os componentes presentes no tecido. De forma gradual ocorre um aumento nas quantidades de açúcares simples e aminoácidos, usados como fontes de carbono na produção de basidiomas. Quanto às enzimas proteolíticas, todos os isolados apresentaram alto nível de atividade.

3.3.1 Enzimas hidrolíticas e suas características

Amilases

As amilases são enzimas responsáveis pela degradação das moléculas de amido. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, trigo, cevada e arroz e em tubérculos como batata e mandioca (BULÉON, 1998). As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA *et al.*, 2003). Sendo disponível comercialmente, as amilases microbianas têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias que processam este polímero (PANDEY *et al.*, 2005).

A natureza físico-química e o pH podem influenciar na atividade enzimática e no número dos microrganismos. Avaliar esses parâmetros envolvidos na atividade amilolítica de rizóbios isolados dos solos da Amazônia foi alvo de pesquisas. Segundo OLIVEIRA, *et. al.*, (2010) as bactérias possuem capacidade para produzir enzimas amilolíticas em níveis significativos em pH 8,0.

As enzimas hidrolíticas amilolíticas são ativas em bactérias isoladas dos nódulos de feijão caupi. Em estudo feito por Oliveria *et. al.* (2006) demonstraram que bactérias provenientes de rizóbias produziram várias enzimas hidrolíticas, com predomínio de amilase (32,8%) e protease (28,4%), seguidas por urease (20,9%). Estas enzimas de origem das rizóbias tem grande importância, e são promissoras para o campo da biotecnologia.

Celulases

A celulose é um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose unidas entre si através de ligações químicas. Esse composto é o polímero mais abundante em nosso planeta. Além de ser um dos principais constituintes da parede celular das plantas, a celulose tem numerosas aplicações industriais. Do ponto de vista

metabólico, a celulose é um metabólito secundário sintetizado quando as condições do meio são satisfatórias do ponto de vista nutritivo (CANNON, 2000).

Algumas bactérias, como a *Acetobacter xylinum*, tem a capacidade de produzir celulose. Essa bactéria do solo que pode ser isolada de frutas caídas no chão. Como parte do metabolismo da glicose, sintetiza subunidades de celulose que são liberadas no meio por extrusão através dos poros da parede celular. A união dessas microfibrilas forma uma película que retém as bactérias formando um biofilme sobre o substrato em decomposição. A celulose de origem bacteriana encontra várias aplicações na indústria, como componente de membranas para *headphones* e como espessante de alimentos e tintas (MALAJOVICH, 2015). A bactéria *Gluconoacetobacter hansenii*, também tem a capacidade de produzir celulose, tendo como principal substrato o glicerol, na proporção de 36 g de celulose/ 100g de substrato. O glicerol é um substrato de baixo custo o que contribui para o decréscimo do custo de produção final deste biopolímero com diversas aplicações biomédicas (ANTÔNIO, et. al., 2012).

As celulasas realizam a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose. As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas. No caso das celulasas, três enzimas fazem parte desse grupo, elas recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases. A capacidade de hidrólise de materiais lignocelulósicos faz com que a celulase seja uma tecnologia em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando seu aumento de produtividade e economicidade. Enzimas celulolíticas podem ser usadas para a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar. As conversões de celulose a glicose das hidrólises de celulose cristalina ou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor com enzimas aderidas ao meio de cultura foram superiores ou iguais àquelas obtidas nas hidrólises com enzimas extraídas do meio de cultura. Assim é importante observar que o custo seria menor pois a aplicação da enzima seria direta, não necessitando de ser extraída do meio de cultura sólido (AFONSO, 2012).

As celulasas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, essas enzimas são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento. Elas atuam degradando as fibras da superfície do tecido, compostas basicamente por celulose. As celulasas também são utilizadas no processo de envelhecimento do jeans, através da remoção

parcial do corante índigo. As duas principais estratégias para a produção de celulases por micro-organismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). O fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis* é utilizado para a produção de celulases. O meio composto por resíduo de uva e peptona ajuda na otimização do meio de cultivo de enzimas celulolíticas. Uma melhor atividade enzimática da celulase ocorre entre os pHs 3,0 e 5,0, a uma temperatura de 60° Celsius (SILVA, 2008).

Xilanases

As enzimas xilanolíticas, capazes de degradar a xilana, podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, no entanto os fungos filamentosos, também se destacam entre os maiores produtores (HALTRICH *et al.*, 1996). De acordo com Haltrich e colaboradores (1996), a produção de xilanases em escala industrial é dominada por *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp*. O princípio de sua utilização nos processos baseia-se no fato de que a xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste em uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil, unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (BIELY, 1985).

Xilanases apresentam grande importância comercial devido a sua aplicabilidade no setor industrial. Destaca-se seu emprego nas indústrias de papel, como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft; seu uso na indústria alimentícia, na fabricação de pães de melhor qualidade, no processamento de sucos, frutas e vegetais, visando à clarificação de sucos e vinhos; assim como, na etapa da filtração da cerveja rompendo sólido em suspensão (BAJPAI, 1997; BECKER, *et al.*, 2009; VIKARI *et al.*, 1994).

Goyal *et al.* em 2008, fez um estudo, para produzir xilanase com resíduos lignocelulósicos ricos em xilana. Foi isolado a *Trichoderma viride*, usando vários substratos lenhocelulósicos em fermentação. Entre os substratos utilizados, palha de milho foi o melhor indutor para a produção de xilanase. A atividade mais alta foi obtida entre 14 e 17 dias de fermentação. Observou-se aumento contínuo na produção de xilanase com o aumento do nível de lignocelulose. A produção de xilanase poderia ser melhorada com o uso de palha tratada com fonte de carbono alcalino.

Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas de proteínas e que apresentam grande importância do ponto de vista industrial, sendo utilizadas em diversas atividades como no processamento de alimentos, bebidas, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, entre outros (REDDY, et. al., 2008). As proteases podem ter várias aplicações biotecnológicas, dentre essas, a aplicação em formulações de detergentes aumentou nos últimos anos porque elas têm desempenho efetivo na remoção de manchas. Outros pontos positivos são que o uso destes biocatalisadores diminuem o uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao meio ambiente; e reduz o consumo de água e de energia (CASTRO *et al.*, 2004). As peptidases são também usadas nas formulações de detergentes para lavar louça (SHOWELL, 1999). Alguns indícios sugerem que peptídeos específicos derivados de alimentos proteicos, podem mimetizar estes mensageiros biológicos, desempenhando um papel significativo na manutenção da saúde e na prevenção de doenças (GAUTHIER; POULIOT, 2003). Peptidases microbianas, de plantas e animais, como as enzimas termolisina, a papaína e α -quimiotripsina são utilizadas principalmente na produção de dipeptídeos e tripeptídeos a partir dos aminoácidos por inversão da reação de hidrólise. Este processo enzimático é aplicado com sucesso para a obtenção de aspartame, angiotensina, dinorfina e eucefalina (KUMAR; BHALLA, 2005).

Industrialmente a grande quantidade de proteases é proveniente de linhagens de *Bacillus*, pois essas bactérias produzem essa enzima em grandes quantidades. As proteases também podem ser extraídas de diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, tecidos de mamíferos e de plantas (RAO, 2006).

As enzimas proteolíticas tem várias aplicações biotecnológicas, dentre essas, podem ser usadas para degradar resíduos agroindustriais. Podem ser usados como substratos os resíduos de pectina de maçã, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho. A eficiência de uma bactérias termofílica *Bacillus* sp., mostrou a sua capacidade de produzir protease por fermentação submersa usando-se como meio de cultura pectina de maçã, proteína de soro de queijo e água de maceração de milho suplementado com micronutrientes. Essa aplicação da protease é promissora

uma vez que a bactéria pode ser usada para decompor os resíduos antes da destinação final (LADEIRA, et. al., 2010).

Lipases

As lipases são uma classe de hidrolases que catalisam a hidrólise dos triglicerídeos de glicerol e ácidos gordos livres através de uma interface óleo-água. Além disso, as lipases catalisam a hidrólise e transesterificação de outros ésteres, assim como na síntese de ésteres. O uso de resíduos agroindustriais como substratos para produção em favor do uso da lipase, sem dúvida, proporcionaria uma redução dos custos de produção associados a substrato. Desenvolvimentos em tecnologias de enzimologia e de DNA recombinante, levou à era atual de enzimas bioengenharia. Muitas indústrias do mundo estão envolvidos na fabricação e comercialização de enzimas usadas em detergentes derivados de microrganismos, tais como várias estirpes de *Bacillus alcalofílica* sp. ou organismos por engenharia genética. Muitas destas enzimas são produzidas por fermentação de microrganismos geneticamente modificados (THAKUR, 2012; HASAN *et al.*, 2010).

O número de lipases disponíveis tem aumentado desde os anos 1980, são utilizadas como biocatalisadores industriais devido às suas propriedades como biodegradabilidade elevada e alta eficiência catalítica. Algumas propriedades únicas da lipase, tais como a sua especificidade, a temperatura, a dependência pH, atividade em solventes orgânicos e não tóxicos natureza leva à sua grande contribuição para as indústrias de processamento de alimentos embora lipases têm várias aplicações imensas interessantes para as indústrias alimentares, de detergentes, farmacêuticas, couro, cosméticos e de papel. Seus usos industriais ainda continuam a ser limitados por seus elevados custos de produção, comercialização em pequenas quantidades, e baixo desempenho de alguns processos (VERMA *et al.* 2012).

L-asparaginase

A L-asparagina amino hidrolase (L-asparaginase) catalisa a hidrólise de L-asparagina em ácido aspártico e L-amônia. L-asparagina é um aminoácido essencial para o crescimento das células tumorais, já o crescimento de células normais é

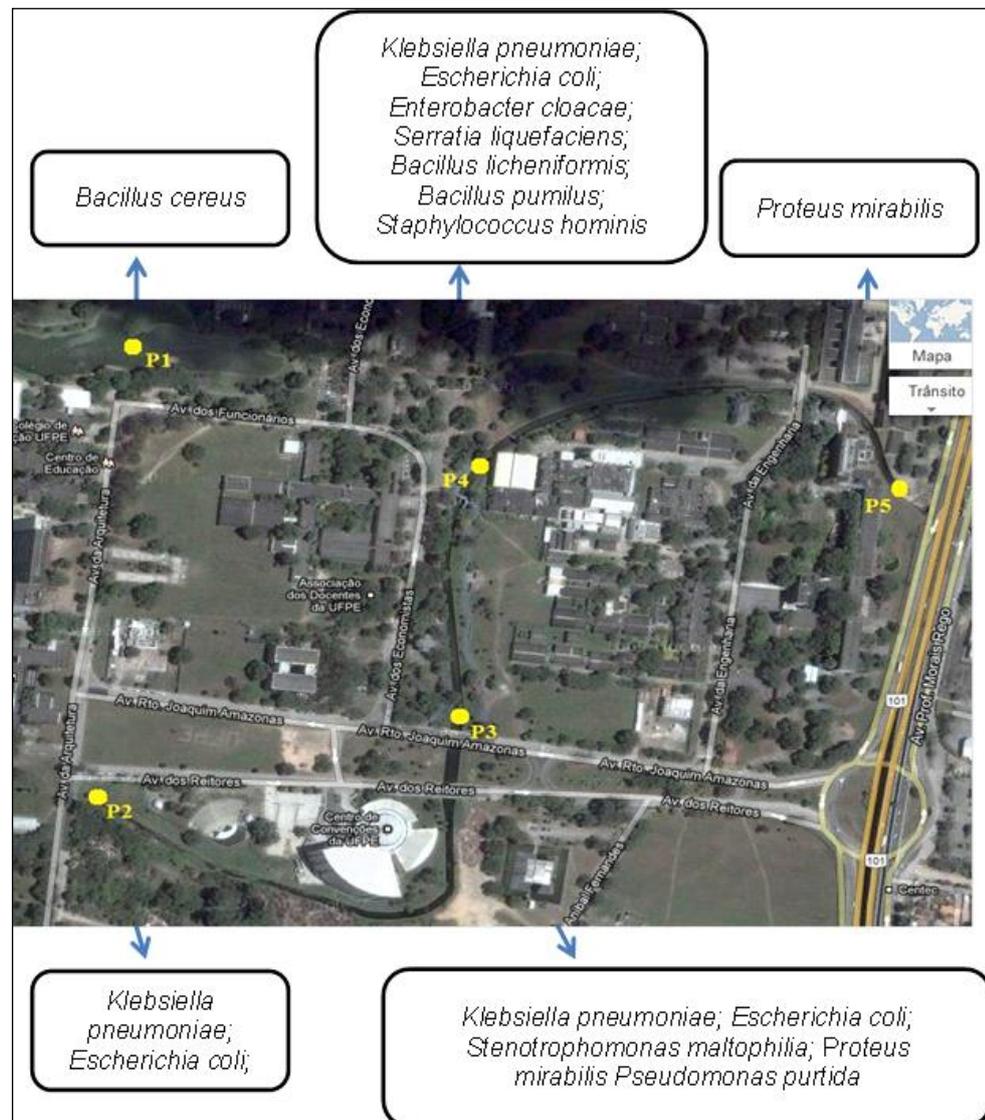
independente da sua exigência (SAVITRI; AZMI, 2003). A L-asparaginase é uma enzima produzida por diversos microrganismos, tais como *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Actinomicetos*, *Streptomyces* (KUMARI et. al., 2011; LOUREIRO, 2010). As aplicações das enzimas L-asparaginolíticas são em sua maioria na área da saúde, especificamente no tratamento de doenças. Vários estudos abrangem o seu uso, Basha et. al. em 2009, realizaram uma pesquisa para verificar a atividade L-asparaginase, isolando actinomicetos marinhos, e selecionando-os para a e caracterizar a enzima. Entre 10 espécies marinhas isolados sujeita a um exame preliminar, apenas 3 isolados demonstraram potencial para a atividade L-asparaginase. Todos os três isolados de solo marinho asparaginase sintetizado com rendimento variando de 24,6 para 49,2 UI / ml. Desta forma essas bactérias podem ser uma fonte potencial de alto rendimento, elevada especificidade para o substrato da L-asparaginase, a qual é um agente anti-leucemia. Ainda no campo de usos medicinais as L-asparaginases são conhecidas como sendo a base para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e são utilizados para o tratamento em todos os regimes pediátricos e adultos. Alguns casos de hipersensibilidade podem ocorrer devido a origem dessas enzimas, então a busca por novas fontes de L-asparaginases é necessário. Jain e colaboradores (2011), fizeram uma pesquisa para procurar microrganismos produtores, e usaram 3 isolados da bactéria *Escherichia coli*. Os pesquisadores sugerem que os isolados L-asparaginase são agentes promissores e requerem uma investigação mais aprofundada dos seus potenciais atividades antileucêmica. A enzima pode ser usada em empresas de fabricação de alimentos, uma vez que é utilizada para reduzir a asparagina presentes nos alimentos e, assim, reduzir o risco de formação de acrilamida, que é um agente cancerígeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência dos isolados

As bactérias foram previamente isoladas em cinco pontos do riacho Cavouco da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os pontos foram a nascente (P1); Ponte do Centro de Tecnologia e Geociência (CTG) (P2), Ponte da Biblioteca Central (P3), Ponte do Lika - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (P4) e Ponte do Hospital das Clínicas (P5) (figura 3) (PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, 2015).

Figura 3 - Percurso do riacho Cavouco no campus Recife da UFPE.



Fonte: PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, 2015.

4.2 Reativação das Bactérias

As bactérias foram reativadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas a 37°C em estufa. No total foram utilizadas 28 bactérias, das espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus hominis*, *Proteus mirabilis*. Para esses isolados foram utilizadas a seguinte nomenclatura: CP₄16P, C (Cavouco). P (ponto que foi coletado), número para classificar o isolado, e a última letra P (coleta 30 cm dentro da água), ou S (coleta feita na superfície).

4.3 Determinação enzimática qualitativa: métodos analíticos e condições experimentais

Para cada microrganismo estabeleceu-se um índice de hidrólise, que é a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o tamanho da colônia, em milímetros. As colônias foram medidas com um paquímetro digital. A determinação qualitativa da atividade enzimática foi realizada em duplicata em placas de Petri com meios de cultura sólido de 15mL contendo substrato indutor como fonte de carbono, os quais foram: amido para amilase, carboximetilcelulose (CMC) para celulase, gelatina para protease, xilano para xilanase, azeite de oliva para lipase e l-asparagina para l-asparaginase. Em seguida foram incubados a aproximadamente 30°C por 24 horas em estufa, sendo acompanhado a cada 12 horas.

A seleção das bactérias produtoras das referidas enzimas foi visualizada com formação de halos de degradação enzimática, pela adição de soluções corantes no meio de cultivo de acordo com a enzima analisada: solução de iodo a 0,1 N; vermelho congo a 0,1% para celulase e xilanase, respectivamente. A protease não necessita de solução corante, à medida que a gelatina é degradada pela enzima o halo enzimático fica bem visível a olho nu. Com o aparecimento de halos, as atividades hidrolíticas bacterianas foram estimadas semi-quantitativamente, usando um índice enzimático (IE), o qual é expresso pela relação do diâmetro médio do halo de degradação (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.3.1 Determinação das enzimas celulolíticas

Utilizou-se em meio de cultura: 200mL de água purificada, 1% de CMC (carboximetilcelulose) (2g), e 3,6g de ágar, em erlenmeyer, pH 6,0. A solução foi levada para a autoclave por 15 minutos a 121°C. O corante utilizado para a observação do halo foi o vermelho congo (*Congo red*) a 0,1%. Para a retirada do excesso de corante foi preparada uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 molar por 30 minutos. Em seguida foi feita a medição da colônia e do halo bacteriano de degradação do substrato com uma régua graduada.

4.3.2 Determinação das enzimas xilanolíticas

Para o preparo da solução, foi usado 1% de xilano (hemicelulose) (2g), ágar 3,6g e 200mL de água purificada, pH 5,0. A solução foi homogeneizada, e levada para a autoclave por 15 minutos a 121°C. Em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri, inoculando o microorganismo e incubado por 24 horas a 37°C. Observando-se o crescimento adequado, as colônias foram coradas com vermelho Congo (*Congo red*) a 0,1%. Para a retirada do excesso de corante foi preparada uma solução de NaCl (cloreto de sódio) 1 molar. Após incubação por 30 minutos para retirada do excesso de corante foi possível visualizar o halo (Adaptado de SILVA et. al., 2005).

4.3.3 Determinação das enzimas amilolíticas

Para este procedimento, foi usado o meio de cultura com 2g de amido, 3,6g de ágar para 200mL de água destilada, pH 5,5. Os componentes foram homogeneizados em erlemeyer de 500mL, e levados a autoclave por 15 minutos a 121°C. E depois distribuídos em placas, inoculados e incubados por 24 horas a 37°C (Adaptado de TEIXEIRA, 1994). Para coloração foi utilizado cristais de iodo em vapor por 5 minutos e em seguida visualizado o halo de degradação (KASANA et. al., 2008).

4.3.4 Determinação das enzimas proteolíticas

O meio de cultura foi composto por 1% de gelatina, e 23 gramas de ágar para 1000mL de água destilada, pH 6,0. Os componentes foram pesados em balança analítica e homogeneizados. A solução do erlemeyer foi levada para a autoclave por 15 minutos a 121°C. Foram 8 placas, 2 placas divididas com 5 inoculações, e 2 placas com 4 inoculações. O procedimento foi realizado em duplicata.

4.3.5 Determinação das enzimas lipolíticas

Para determinar qualitativamente a capacidade enzimática bacteriana para lipase foram realizados procedimentos de preparação e verificação da visualização do halo de degradação ao redor de colônias bacterianas. Preparou-se duas soluções, uma contendo 300mL de água, com 1,5g de goma arábica, e 10mg de rodamina em erlemeyer de 500mL e a outra contendo 6mL de azeite de oliva extravirgem, e 6mL de Tween 80 em um Becker de 100mL. Adicionou-se vagorosamente a solução 2, na solução 1, homogeneizando lentamente e ajustando o pH para 6,73. O erlemeyer foi levado para a autoclave por 15 minutos a 121°C. O meio foi distribuído em placas de Petri, onde foram inoculadas as bactérias. As placas foram levadas para uma estufa a 37°C durante 24 horas. A observação do halo foi realizada após a adição do corante de rodamina sobre as colônias bacterianas.

4.3.6 Determinação das enzimas L-asparaginolíticas

Para a determinação da produção de enzimas L-asparaginolíticas, preparou-se o meio de cultura a partir de, 1,8g de sódio di-hidrogeniofosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4), 0,15g de Cloreto de sódio NaCl, 1,5g de L-asparagina, 0,15g de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,004 de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,6g de glicose, 0,027g de vermelho de fenol (corante), e 7g de ágar, para 300mL de água purificada em um Becker de 500mL, pH 6,0. Homogeneizou-se os componentes, seguido da autoclavação por 15 minutos a 121°C. Depois foi distribuído em placas, e inoculado as bactérias. As placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37°C. A leitura dos halos foi realizada,

determinando a produção como positiva, ou negativa conforme o observado. Os resultados da produção enzimática pelas bactérias foram expressos, em gráfico e tabela conforme os resultados.

4.4 Detecção dos Halos em meio sólido

A formação de halo ao redor da colônia da bactéria indica a produção de enzimas hidrolíticas, identificada diretamente através da presença de um halo transparente no meio sólido. Para confirmar a produção de celulase, xilanase, amilase, lipase, e l-asparaginase foi usada uma solução corante como revelador que foi descrita por Teixeira (1994). Para a detecção do halo da amilase, uma solução 0,1 M de iodeto foi utilizada, e para verificar a atividades de celulase e xilanase foi usada uma solução a 0,1% (v / p) de solução de vermelho do Congo. Para a lipase utilizou-se uma quantidade de rodamina, e no ensaio da l-asparaginase o vermelho de fenol.

4.5 Fermentação e atividade enzimática dos isolados

Inicialmente a bactéria que demonstrou positividade foi plaqueada em BHI contendo ágar em placa de Petri, e depois incubada por 24 horas a 37°C em estufa. Passando-se as 24 horas, a bactéria foi repicada para um meio contendo 5mL de BHI em caldo em tubo de ensaio, por 24 horas em *Shake* a 37°C. Depois das 24 horas foi inoculado 500 microlitros do caldo de BHI em 5mL de meio líquido com a mesma composição do teste qualitativo específico para cada enzima. Foi realizada a fermentação para os isolados que demonstraram atividade positiva, para os testes qualitativos realizados na 1ª fase da pesquisa, na qual testes contendo os substratos em meios de cultura específicos para cada enzima revelaram as bactérias que demonstraram possível potencial positivo. Para o armazenamento das amostras em freezer, foram centrifugadas os meios líquidos de fermentação depois de decorrido 24 horas no *shake*. Assim usou-se a centrífuga a 120 RPM por 5 minutos, no qual os 5mL do meio foi dividido em 2 Eppendorfs, e retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta automática para outro eppendorf, que foi levado para a geladeira.

4.6 Quantificação da atividade enzimática

Determinação da atividade da Celulase: endoglucanase (CMCase)

O ensaio quantitativo foi realizado em duplicatas em eppendorfs. A dosagem enzimática foi feita com 50µL de CMC a 1% com tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e 50µL de extrato enzimático pH 6,0. A solução foi incubada em banho Maria a 50° C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 100µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Em seguida foi fervida por 5 minutos a 100°C. Adicionou-se 750µL de H₂O destilada. O branco da análise continha 50µL do substrato, 100µL de DNS, e 750µL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro comprimento de onda de λ 540 nanômetros (GHOSE, 1987).

Determinação da xilanase

Dosou-se as enzimas xilanolíticas com o substrato 75µL de xilose 1% (tampão acetato de sódio pH 5,0 a 50 mM) com 50µL da enzima. A solução foi incubada por 10 minutos a 50°C. Interrompeu-se a reação com 125µL de DNS. Depois foi fervida por 5 minutos a 100°C. Adicionou-se 500µL de H₂O, e leu-se a 540nm. Foi usado como branco o substrato sem a enzima. O branco foi uma solução preparada com o intuito de medir a quantidade de açúcares redutores já presentes, para assim determinar a atividade exata da enzima através da quebra da xilose.

Determinação da amilase

A dosagem enzimática foi realizada com 100µL de amido a 1% tampão acetato de sódio 50mM pH 5,5 com 50µL da enzima. A solução foi incubada a 37° C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 150µL de DNS e fervida por 5 minutos a 100°C. Depois adicionou-se 100µL de H₂O destilada. A leitura foi no comprimento de onda de λ 550 nanômetros. Para o branco foi usado a mesma solução com sem a solução enzimática (COMPTON; JONES, 1985).

Determinação da atividade das enzimas proteolíticas

Para determinar a atividade enzimática foi utilizada a metodologia modificada de Fry *et al.* (1994). Foi adicionado 500µL do substrato gelatina 1.0% (m/v) (tampão Tris-HCl 1.5 M (pH 6.0) contendo 0.01% acetato de sódio) 500µL do sobrenadante dos fermentados enzimáticos. A solução foi incubada a 30°C por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 1,5mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v) para os ensaios. O branco foi preparado combinando TCA com a solução a ser testada e então adicionado o substrato. Todos os ensaios ficaram em repouso por 30 min. A leitura de absorvância do filtrado com relação ao branco foi realizada em cubeta de quartzo a 595nm, Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar um aumento de 0,01 U na absorvância a 595nm sob as condições do ensaio.

Determinação da atividade de lipase

A dosagem foi realizada de acordo com a metodologia modificada de ROWE & HOWARD (2002). Foi preparada uma solução de p-nitrofenil palmitato na qual pesou-se 0,125g de p-Npp e dissolveu-se em 25mL de álcool etílico absoluto. Uma solução de 0,5N de carbonato de sódio foi preparada, pesando-se 5,29g em 100mL de água destilada. Foram usados 30 ependorfs que corresponderam a triplicata das 10 amostras das bactérias que foram feitas qualitativamente. Em cada eppendorf colocou-se 25 µL da solução enzimática, com 250 µL de solução tampão Tris HCl 0,05M pH 9,0, 250 µL de solução de p-nitrofenil palmitato. Depois foram incubados em banho Maria a 30°C por 5 minutos. Interrompeu-se a reação com 500 µL da solução de carbonato de sódio. A solução foi centrifugada, e retirou-se 500 µL do sobrenadante. Esse sobrenadante foi adicionado a 450 µL de água destilada. Foi feita a leitura a 405nm em espectrofotômetro. O branco da amostra não continha a solução enzimática, em substituição usou-se água destilada.

Determinação da atividade L-asparaginase

Para a dosagem das enzimas L-asparaginolíticas foram preparadas as soluções de 100mL tampão Tris HCl 0,05M e pH 9,0 com 16mM de L-asparagina. Em 60 eppendorfs (triplicata dos 20 isolados), foram adicionados 100 µL da enzima, com 100 µL da solução tampão com L-asparagina. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos em banho Maria. Depois foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi retirado, e diluído em 450 µL de água destilada. Adicionou-se 150 µL do reativo de Nessler. Por fim, foi verificado a leitura em absorbância a 500nm. O branco foi composto de 100 µL de água destilada e 100 µL de tampão Tris com L-asparagina.

4.7 Determinação de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem de proteínas dos isolados foi realizado depois de fermentado, centrifugado, sendo usado o sobrenadante. Para o experimento usou-se 50µL da amostra, com 100µL do reagente de Bradford, e 250µL de água destilada Em um eppendorf foram colocados os componentes, durante cinco minutos. A leitura ocorreu em espectrofotômetro a 595nm. Para o branco usou-se 300 de H₂O e 100 de reagente de Bradford, sendo este usado para padronizar a leitura.

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON, 1985).

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por análises de regressão com base em duas e três repetições experimentais. A análise para os isolados foi realizada com software estatístico *Microsoft Excel 2010*. Com os dados das absorbâncias foi possível traçar

a curva de calibração em relação a cada substrato, e comparar cada produção enzimática bacteriana isolada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias previamente isoladas do riacho Cavouco apresentaram importância biotecnológica, uma vez que 71% produziram enzimas l-asparaginólíticas, 43% proteolíticas, lipolíticas 36% e celulolíticas 29%. As enzimas Amilase e Xilanase, foram as menos expressas apresentando respectivamente, 21% e 10%, (figura 4).

Os dados obtidos corroboram com dados da literatura, onde observa-se diversidade quanto ao potencial de produção de enzimas hidrolíticas seja em relação ao organismo seja em relação ao local de isolamento, isto é: água, sedimento, esgoto, dentre outros (Mendes et al., 2015; Albuquerque 2009).

Mendes *et. al.*, (2015), também demonstraram diversidade na produção de enzimas hidrolíticas em isolados fúngicos provenientes da Amazônia. A pesquisa foi feita para avaliar a produção de celulase, protease, pectinase, amilase e xilanase. Os resultados demonstraram que dos 40 fungos amazônicos investigados, 16 produziram celulase; 13 protease; 13 pectinase, 27 amilase e 16 atividade xilanolíticas.

Figura 4 - Percentual de produção das enzimas hidrolíticas em amostras de isolados do riacho Cavouco.

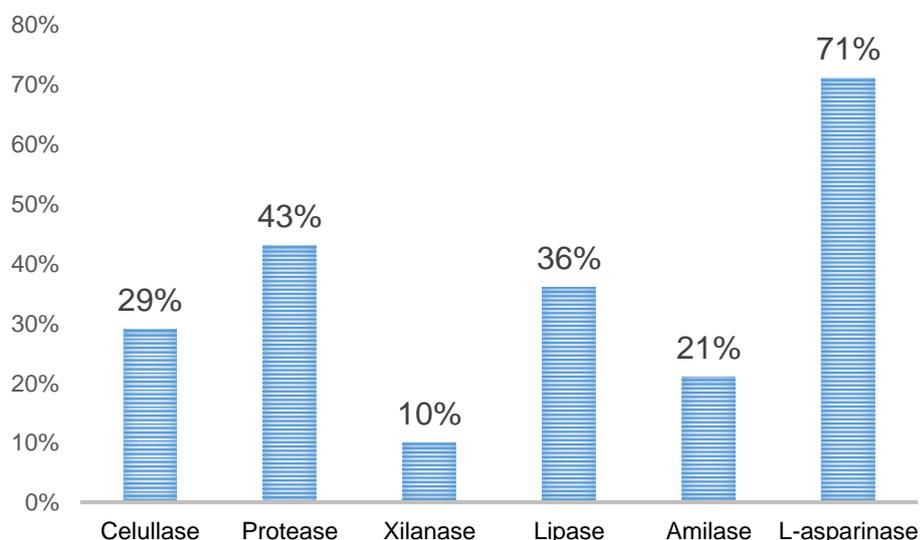
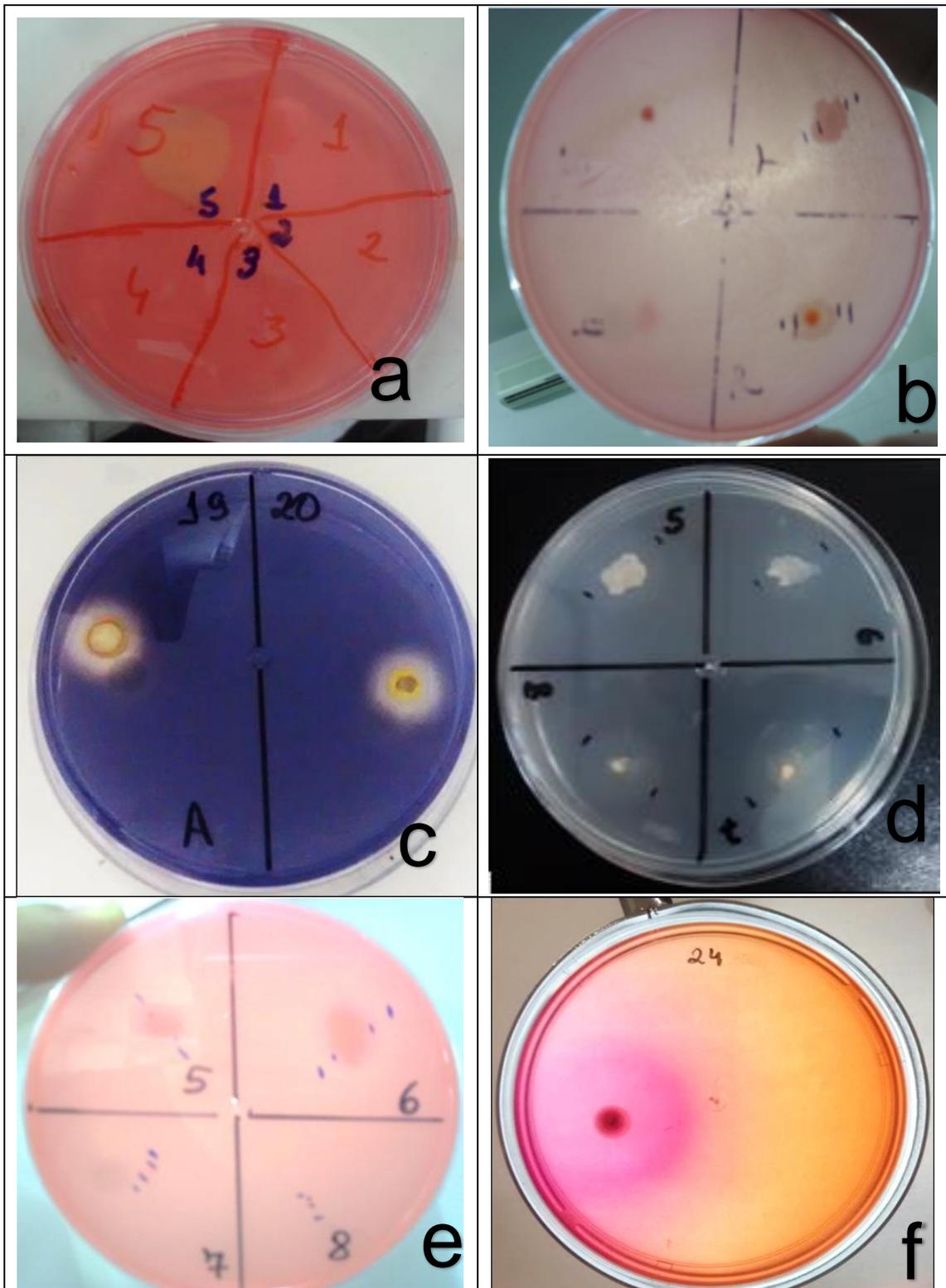


Figura 5 - Placas de Petri com os melhores resultados qualitativos para os isolados.



Fonte: O Autor (2016).

Na figura 5, em cada quadro podem ser classificadas as placas: celulase (a), xilanase (b), amilase (c), protease (d), lipase (e) e L-asparaginase (f). No quadro (a)

observou-se aparecimento de uma área clara ao redor da colônia bacteriana distinta do meio de cultura, este foi o halo de degradação da celulose, esse halo mostra a positividade para celulase. O quadro (b), verificou-se a produção de xilanase.

No quadro (c) da figura observa-se placas com produção positiva para amilase. O gênero *Bacillus* isolado CP₁1S é um dos mais importantes e investigados grupos de bactérias produtoras de amilase comercial. A estimulação da produção de enzimas amilolíticas, os substratos de carbono usados no meio de cultivo têm recebido atenção especial. Fontes de carbono como dextrina, frutose, glicose, lactose, maltose, amido solúvel, deixam o preço da produção não viável. Com o objetivo industrial, a substituição do substrato pode ser por subprodutos agrícolas de baixo custo, o que torna o processo de produção dessas enzimas com um baixo custo (PANDEY, *et. al.* 2000).

De todas as amostras testadas o ensaio para enzimas l-asparaginolíticas demonstrou o melhor resultado, observa-se no quadro (f) a formação de uma área vermelho claro em torno da colônia bacteriana. Há uma grande evidência de formação do halo na cor rosa em volta da colônia. Esse halo indica a liberação de enzima l-asparaginase. A formação do halo avermelhado, está, provavelmente, relacionada ao aumento do pH do meio devido a degradação do substrato L-Asparagina e consequente liberação de amônia. Também pode ocorrer a elevação do pH do meio, por conta de outros metabólitos bacterianos, e consequentemente, pelo aparecimento do halo vermelho ao redor da colônia (ALMEIDA, 2015).

No presente estudo observou-se variabilidade na produção de enzimas por espécie. Alguns isolados das espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidos de um mesmo ponto apresentaram perfis distintos para algumas enzimas. Esse pode ser um indicativo da presença de populações bacterianas nesse ambiente. Os isolados (CP₃13P, CP₂2P e CP₃8S) todos pertencentes a espécie *K. pneumoniae* foram os que apresentaram o maior potencial para produção de enzimas hidrolíticas, ou seja, produziram quatro das seis enzimas investigadas. Os demais produziram de duas a três enzimas (Tabela 1). As bactérias CP₃13P e CP₂2P obtiveram produção enzimática para celulase, protease, lipase, e l-asparaginase e a amostra CP₃8S demonstrou produção de protease, xilanase, lipase e l-asparaginase. Dos microrganismos que produziram 3 das 6 enzimas testadas estão as bactérias (CP₃6S; CP₃10P; CP₃9P; CP₃12P; CP₄1B₂, CP₄1B; CP₄16P; CP₄17P) ver tabela 1. Apenas um isolado (CP₃5S) não demonstrou potencial para produção de enzimas hidrolíticas.

Em relação a medição dos halos bacterianos, especificamente para a celulase os maiores halos foram identificados nos isolados CP₃10P, e CP₄19S. Para a xilanase foram os CP₃8S e o CP₃9P. Já para a protease CP₃6S e o CP₂2P. Para a lipase e amilase foram CP₃12P e CP₃13P e CP₁1S e CP₄20P, respectivamente. Para l-asparaginase os melhores resultados foram para CP₅21S, CP₅29P e CP₄18S (Tabela 2 e 3).

A utilização industrial das enzimas têm vantagens inigualáveis, existe o interesse em adaptar métodos enzimáticos para as exigências de seus processos. A aplicação clínica de enzimas vem sendo frequentemente utilizada, como por exemplo, a utilização de enzimas proteolíticas para a remoção de tecidos desvitalizados em feridas (ZHANG; KIM, 2010).

Segundo Sotero-Martins (2003), sobre a fusão de asparaginase II-GFP como ferramenta para estudo da via secretora de enzima sobre depleção por nitrogênio, a produção de asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* é regulada por nitrogênio. No estudo foi usado como método a fusão da proteína "*green fluorescent protein*" (GFP) de *Aequorea victoria* com a carboxi-terminal de Asp3p por integração genômica da sequência de GFP ao locus ASP3. Assim ocorreu a depleção para nitrogênio, em células portadoras do gene quimérico *ASP3-GFP*, aumentaram a fluorescência, assim como a expressão de ASP3. Foi observado que Asp3-GFPp pode ser utilizada para estudar a secreção de asparaginase II em células submetidas à privação de nitrogênio *in vivo*.

Isolados	Espécie	Celulase	Protease	Xilanase	Lipase	Amylase	L-Asparaginase
CP ₄ 16P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+
CP ₃ 6S	<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	-	+	-	+
CP ₃ 7S	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	+
CP ₃ 10P	<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	+
CP ₃ 12P	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	-	+	-	-
CP ₃ 13P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	+
CP ₂ 2P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	+
CP ₃ 9P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	-
CP ₄ 17P	<i>Serratia liquefaciens</i>	+	-	-	+	+	+
CP ₃ 8S	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	+
CP ₄ 18S	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	+	-	-	-	-
CP ₄ 19S	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	-	-	-	+
CP ₂ 3P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	-	-
CP ₃ 5S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
CP ₂ 4P	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+
CP ₄ 14S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₄ 15S	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	-
CP ₃ 11P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+
CP ₁ 1S	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	+	-
CP ₄ 20P	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	+	-
CP ₅ 22S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₅ 25S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₅ 28P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-	-	+
CP ₅ 21S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₅ 29P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-	-	+
CP ₅ 23S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₅ 26P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+
CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	+

Isolados	Espécie	Celulase				Protease				Xilanase					
		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 1		Amostra 2	
		Col	Halo	Col	Halo	Col	Halo	Col	Halo	Col	Hal	Col	Halo	Col	Halo
CP ₄ 16P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,7
CP ₃ 6S	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	1,2	2,3	1,2	2,6	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 7S	<i>Escherichia coli</i>	0,6	1,9	0,7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 10P	<i>Escherichia coli</i>	0,4	1,5	0,5	2,0	0,7	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 12P	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,4	0,5	-	-	0,9	1,9	0,7	1,9	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 13P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	0,7	1,6	0,9	1,6	-	-	-	-	-	-
CP ₂ 2P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	0,7	-	-	1,2	2,3	0,7	1,5	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 9P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	0,6	1,8	0,3	1,4	-	-	-	-	0,6	0,7
CP ₄ 17P	<i>Serratia liquefaciens</i>	0,3	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 8S	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	0,7	1,4	0,9	2,1	-	-	1,1	1,2	0,5	0,6
CP ₄ 18S	<i>Bacillus licheniformis</i>	0,3	0,6	-	-	0,6	1,6	0,6	1,4	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 19S	<i>Bacillus pumilus</i>	0,3	1,6	0,3	1,6	0,3	1,2	0,7	1,6	-	-	-	-	-	-
CP ₂ 3P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 5S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₂ 4P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	0,3	1,4	0,7	1,4	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 14S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 15S	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 11P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₁ 1S	<i>Bacillus cereus</i>	0,7	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 20P	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 22S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 25S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 28P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	0,5	1,7	0,5	1,8	0,4	1,6	-	-	-	-
CP ₅ 21S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 29P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	0,6	2,1	0,5	1,9	0,5	2,0	-	-	-	-
CP ₅ 23S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 26P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3 - Produção de lipase, amilase e L-asparaginase, com as medições dos halos em bactérias isoladas do Riacho Cavouco.

Isolados	Espécie	Lipase				Amilase				L-asparaginase ⁴⁷			
		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 1		Amostra 2	
		Col	Halo	Col	Halo	Col	Halo	Col	Halo	Col	Halo	Amostra 1	Amostra 2
CP ₄ 16P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,7	1,3			0,4	1,0	0,6	1,2	0,3	0,9	+	+
CP ₃ 6S	<i>Pseudomonas putida</i>	0,9	1,6	0,4	1,0	-	-	-	-	-	-	++	++
CP ₃ 7S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
CP ₃ 10P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₃ 12P	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,7	1,7	1,0	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 13P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,0	1,9	0,9	1,8	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₂ 2P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,4	0,9			-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₃ 9P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,2	0,6			-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 17P	<i>Serratia liquefaciens</i>	0,6	1,1	1,1	1,6	0,5	0,7	0,4	0,7	0,5	0,9	++	++
CP ₃ 8S	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,3	2,0			-	-	-	-	-	-	+++	+++
CP ₄ 18S	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₄ 19S	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₂ 3P	<i>Escherichia coli</i>	0,6	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃ 5S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₂ 4P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
CP ₄ 14S	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₄ 15S	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,6	0,9	-	-	0,4	0,9	0,5	1,0	0,4	0,8	-	-
CP ₃ 11P	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	0,5	0,8	0,6	1,2	0,4	0,8	+	+
CP ₁ 1S	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	0,5	1,1	0,8	1,4	0,7	1,5	-	-
CP ₄ 20P	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	0,6	1,0	0,8	1,4	0,7	1,3	-	-
CP ₅ 22S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
CP ₅ 25S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₅ 28P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₅ 21S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
CP ₅ 29P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
CP ₅ 23S	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CP ₅ 26P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
CP ₅ 27P	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++

Fonte: O Autor (2016).

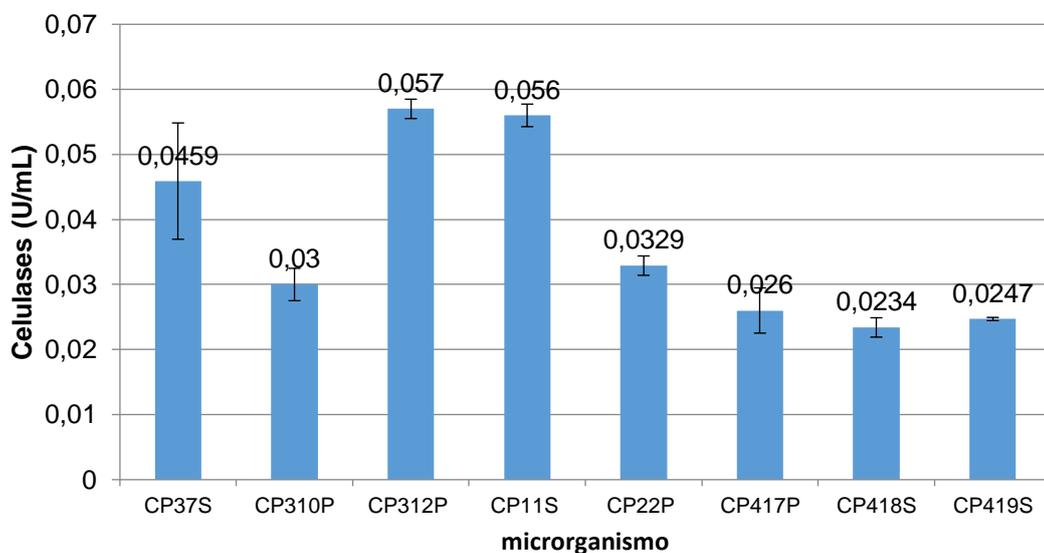
DOSAGEM DAS ENZIMAS

Celulase

Com os dados obtidos traçou-se uma reta por μL de glicose a 540nm de absorbância. Ao medir as absorbâncias foi possível notar que esses valores são diretamente proporcionais às concentrações de glicose obtida em cada tubo. Isto ocorreu pois, quanto maior a concentração de glicose, maior será a formação do DNS, que é o responsável pela cor alaranjada das soluções e, conseqüentemente, pelas medidas de absorbância. A partir da proporcionalidade entre absorbância e concentração obteve-se uma curva de calibração, ou seja, um gráfico relacionando a absorbância (Abs) e a concentração da amostra em microlitros (μL). Com a curva de calibração formada determinou-se o R^2 , que foi o coeficiente de determinação e junto ao coeficiente de correlação R a linearidade do método desenvolvido. A equação da reta $y=a.x + b$, onde $\text{Abs} = a.[\text{concentração}] + b$. Na reta da celulase e equação ficou definida como: $y= 1,8989x - 0,0179$. O R^2 foi 0,9936, tendo um valor alto, pois as amostras que tem uma linearidade próxima a 1,0000, são consideradas elevadas. O cálculo da unidade de atividade enzimática foi feito no Excel usando a seguinte fórmula:

$$=(((\text{Absorbância}+0,0179)/1,898)/30)*20$$

Figura 6 - Atividade dos isolados para a celulase em U/mL.

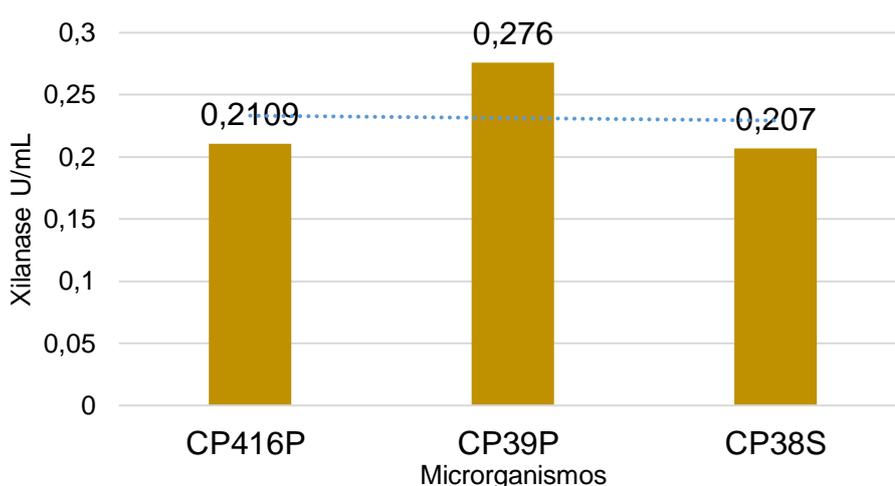


A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U por mililitro de substrato (U/mL). Para a celulase foram testados oito isolados bacterianos. A melhor taxa de unidades por mililitro foi para o isolado CP₃12P com 0,05721 U/mL, com um valor aproximado do isolado CP₃13P que obteve 0,05669 U/mL. A menor quantificação foi verificada no isolado 0,02349 U/mL (figura 6).

Xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana. Considerado que o valor do R^2 ficou próximo a 1,0, a curva de calibração foi ótima. A linearidade do gráfico também foi considerada satisfatória uma vez que não houve discrepância entre os pontos de medidas das absorbâncias. Na dosagem da xilanase, o isolado CP₃9P apresentou a maior atividade. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, neste caso xilose por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U por mililitro de substrato (U/mL), figura 7.

Figura 7 - Atividade em U/mL dos isolados para a xilanase.



Trabalhos de Passarinho (2014), mostram a produção de xilanases a partir de bactérias. O uso de duas xilanases recombinantes, uma com as mutações, e outra

sem mutações, derivadas do gene XYNA de *Orpinomyces*, foram expressas em *E. coli*, purificadas e caracterizadas bioquímica e cineticamente com o substrato arabinoxilana de trigo, visando aplicações na tecnologia de alimentos. A endo-1,4- β -xilanasase é a principal constituinte do sistema enzimático xilanolítico devido à sua atuação na hidrólise da xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular de plantas. As xilanases sem mutações e com mutações expressas em *E. coli* apresentaram elevada atividade específica com o substrato arabinoxilana de trigo e foram eficientemente purificadas por cromatografia de troca iônica.

Amilase

Nos testes quantitativos não foi verificado valores significativos de dosagem em espectrofotômetro. Assim confirma-se o teste qualitativo demonstrando que as bactérias do riacho Cavouco produzem pouca enzimas amilolíticas de caráter extracelular. Isso pode ser ocasionado pela carência do substrato que serve como base na produção da enzima no rio, desta forma as bactérias do Cavouco provavelmente não tem potencial satisfatório para a produção de amilase.

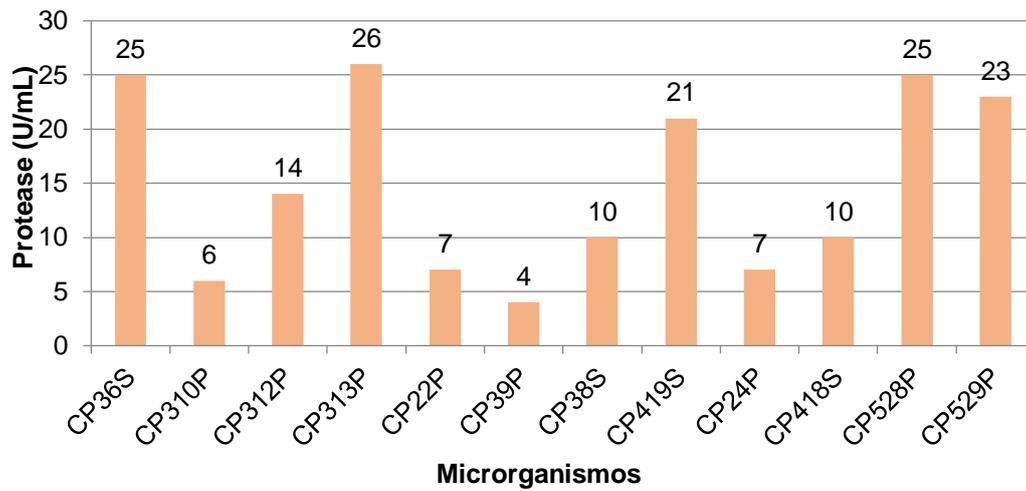
Protease

Através das medições feitas na tabela abaixo, evidenciou-se baixas medidas quantitativas de enzimas proteolíticas relacionadas as bactérias isoladas do riacho Cavouco, a mais elevada foi no isolado CP₃13P. No gráfico de dosagem da protease, foi expresso a unidade enzimática, que causa o aumento de 0,01 U na absorbância a 595 nm. Sendo 12 isolados bacterianos (figura 8).

O cálculo foi feito com a seguinte equação no programa Excel:

$$=(((\text{Absorbância})/0,01)*10) = 1 \text{ Unidade}$$

Figura 8 - Dosagem de Protease em U / mL em diferentes microrganismos

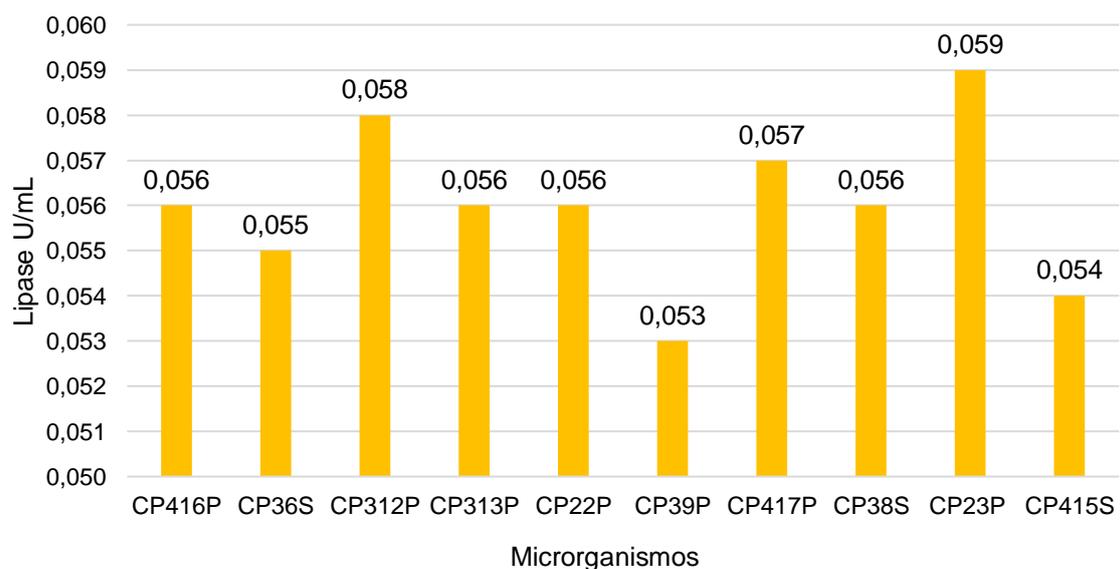


Lipase

Foi feita uma reta com p-nitrofenol para gerar a curva de calibração para a lipase e montar a equação para calcular a U/mL da lipase (figura 9). O cálculo feito no programa Excel para a determinação da unidade de atividade enzimática foi definido como:

$$=(((\text{média absorvância}+2,3668)/31,958)/15)*10$$

Figura 9 - Dosagem de Lipase U/mL em diferentes microrganismos



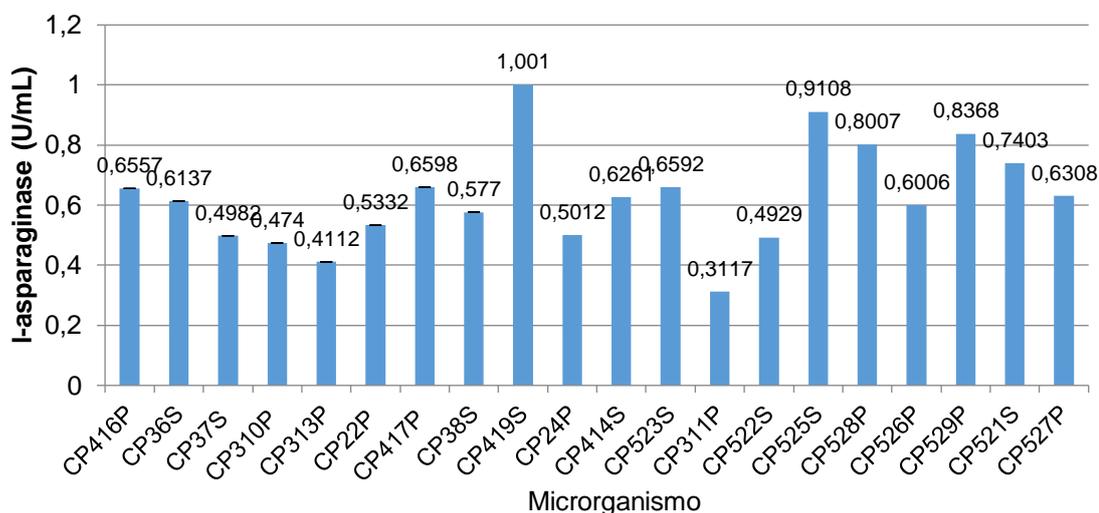
L-asparaginase

Foi gerada uma reta com sulfato de amônia, a equação foi utilizada para calcular a U/mL da enzima l-asparaginase nos substratos (figura 10). Com a equação da reta definida, foram realizados os cálculos da unidade de atividade enzimática. A equação usada no programa Excel foi definida como:

$$=((((Absorbância-0,0811)/2,8408)/132,14)*2000)/30)*10$$

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 unidade de l-asparagina por mL a 37° C por minuto, figura 10.

Figura 10 - Atividade dos isolados para a l-asparaginase em U/mL.



O gênero de bactéria que se destacou foi o *Proteus*. A alta produção de l-asparaginase pelo gênero *Proteus* já foi evidenciado em algumas pesquisas. Esta enzima foi produzida com rendimentos elevados quando as células foram cultivadas em condições aeróbias num meio contendo fumarato de sódio e água de maceração de milho. A adição de glicose, ou não, de amônio ao meio, no entanto, resultou na produção de l-asparaginase diferenciada (TOSA, *et. al.*, 1971). A L-Asparaginase é uma enzima muito importante para o tratamento de pessoas com leucemia linfóide aguda. Assim que é injetada a enzima L-Asparaginase na corrente sanguínea do indivíduo que apresenta a doença, as reservas de L-Asparagina, fonte de energia das células cancerosas, são totalmente convertidas em ácido aspártico e amônia. Sem o aminoácido para metabolizar, as células tumorais morrem, pois não são capazes de

synthetizar o aminoácido por si mesmo. Em contrapartida, células normais não são afetadas pela ação da enzima, pois, ao contrário das células cancerosas, são capazes de synthetizar o aminoácido para seu desenvolvimento e sobrevivência (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

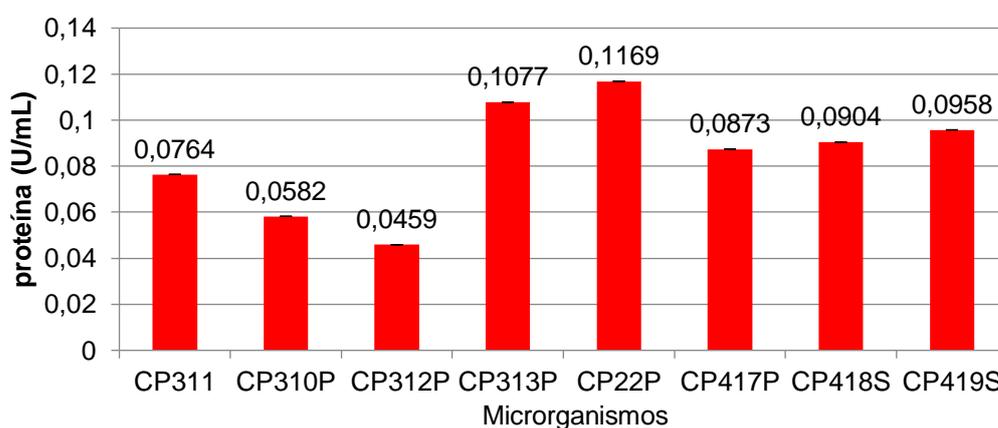
Determinação das proteínas pelo método de Bradford

Na determinação de uma proteína pelo método de Bradford, a cor de um corante muda de marrom para azulado (medida pela absorbância da luz em um comprimento de onda de 595 nm) é proporcional à concentração de proteína presente. O substrato usado na determinação da reta de proteínas foi sulfato de amônio. Para a confecção da curva de calibração foi usado como substrato o sulfato de amônia, o reagente de Bradford e água. A equação para o cálculo de unidade da atividade da enzima foi definido de acordo com a equação feita no Excel:

$$=((\text{Absorbancia}-0,0013) /12,15) *7$$

As proteínas podem ser quantificadas por vários métodos espectrofotométricos. O método de Bradford, é mais rápido e sensível que o de Lowry e cols. (LOWRY, *et. al*, 1951). É uma maneira de se conhecer a quantidade de proteínas com que se está trabalhando, além de ser vantajoso por permitir o reaproveitamento das amostras. A principal desvantagem é a possível interferência de outros compostos, que geralmente contaminam a amostra, mas são poucos esses agentes de interferência. O método de Bradford também pode ser usado para a determinação de proteínas totais em leite humano (BERGQVIST, *et. al.*, 1989)

Figura 11 - Dosagem de Bradford para a celulase.



Na figura 11, o isolado *Klebsiella pneumoniae* – CP₂2P, demonstrou a melhor atividade da proteína em U/mL. E a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* - CP₃12P teve a menor medição de proteínas. Na dosagem de proteína pelo método de Bradford em bactérias produtoras de xilanase observou-se que o isolado *Klebsiella pneumoniae* CP₃8S obteve 0,0701 de U/mL, confirmando a medição do halo que o mesmo isolado também demonstrou o melhor a melhor degradação do substrato (figura 12).

Figura 12 - Dosagem de proteínas de Bradford para a xilanase

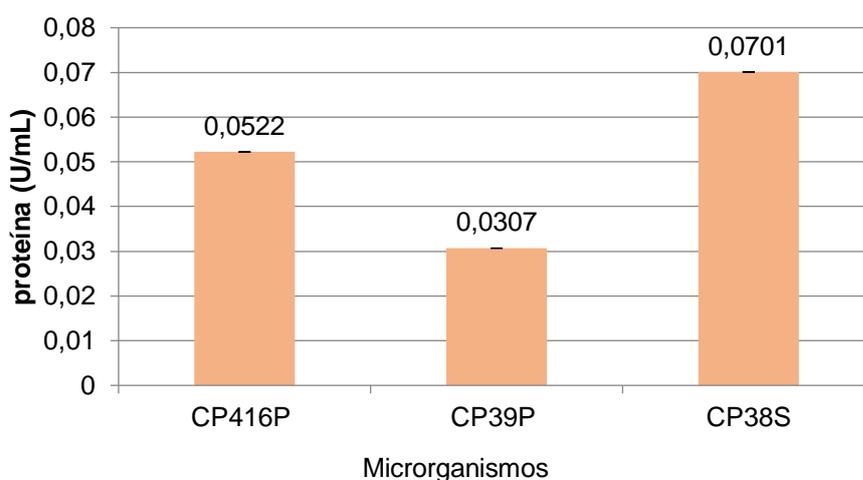
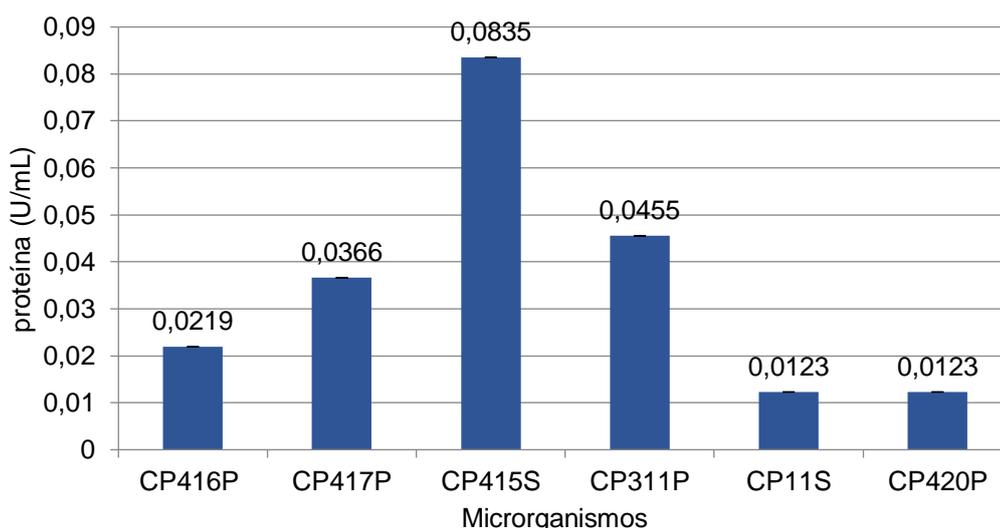


Figura 13 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de amilase



Verificou-se uma baixa dosagem de proteínas dos isolados para amilase, o valor mais alto foi CP₄15S. Outros estudos relatam baixa dosagem na quantificação da enzima (figura 13).

Costa e colaboradores (2011), fizeram um estudo que avaliou a capacidade amilolítica de leveduras *Ipomoea batatas Lam*, isoladas de batata-doce. Foi testada a capacidade amilolítica de 98 linhagens em meio sólido contendo amido solúvel, 16 apresentaram resultado positivo. A produção de α -amilase e glicoamilase das 16 linhagens foram avaliadas em cultivo submerso contendo 2% de amido solúvel e foram obtidos valores entre 0,010 e 0,48 U/mL para α -amilase. As linhagens não apresentaram valores para a glicoamilase.

Nas figuras 14, 15 e 16 observa-se a dosagem de proteínas de Bradford respectivamente para a protease, lipase e l-asparaginase. Destacando-se na figura 16 uma quantidade significativa de proteínas que foram confirmadas pois a l-asparaginase foi a enzima mais produzida pelas bactérias do Cavouco.

Figura 14 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de protease

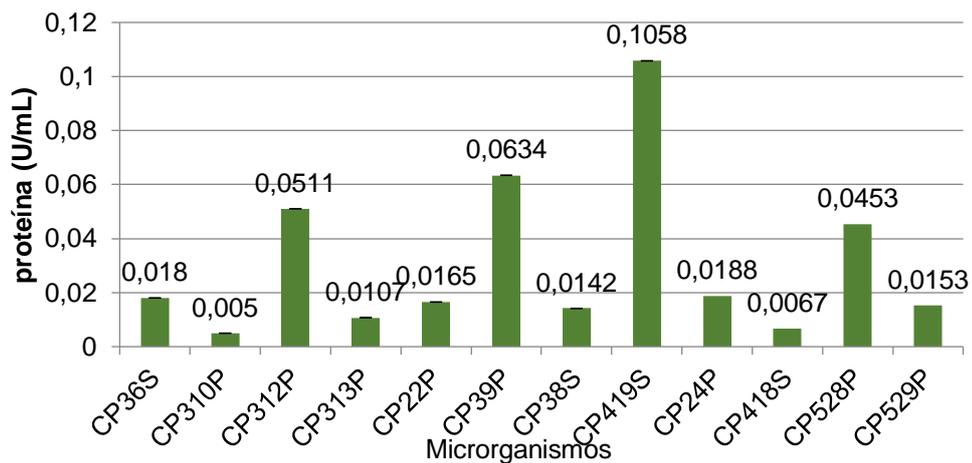


Figura 15 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de lipase

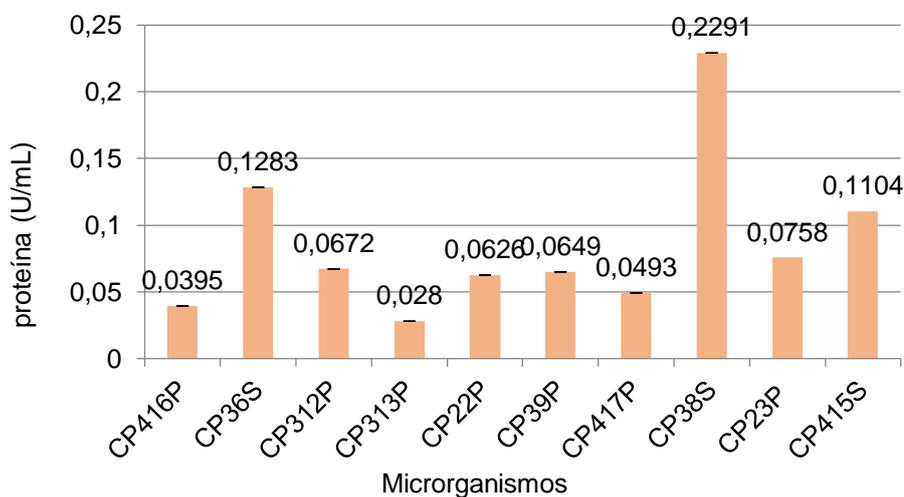
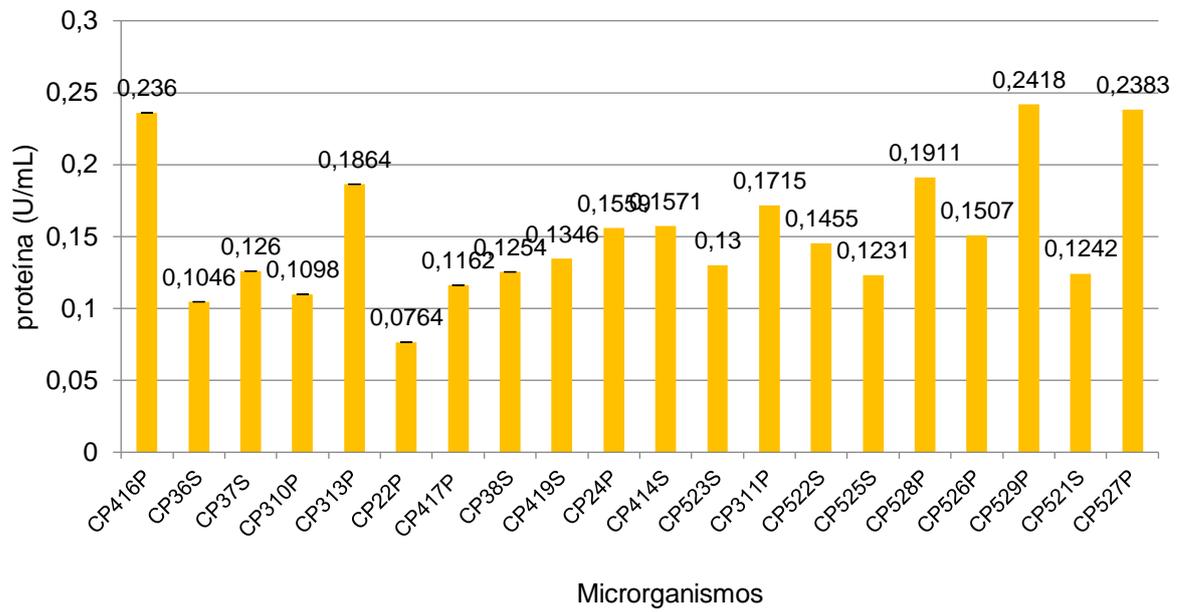


Figura 16 - Dosagem proteínas (U / mL) pelo método de Bradford em diferentes microrganismos produtores de L-asparaginase



6 CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível verificar o potencial biotecnológico das bactérias do riacho Cavouco. Cerca de 71% das bactérias produziram enzimas l-asparaginolíticas, 36% produziram lipases e 43% enzimas proteolíticas. Houve variabilidade na produção de enzimas por bactérias provenientes de um mesmo ponto, o isolado CP₃13P que produziu celulase, protease, lipase e l-asparaginase e a CP₃9P que produziu protease, xilanase e lipase, indicando, desta forma, divergência populacional. A partir desta pesquisa espera-se uma maior aplicação de enzimas hidrolíticas provenientes das bactérias obtidas do riacho Cavouco, como novas fontes de enzimas, especialmente de menor custo. Essas enzimas podem ser aplicadas principalmente na indústria, como a lipase e a protease, direcionadas para resíduos de indústrias alimentícias e a l-asparaginase para resíduos da indústria de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- AIZAWA, T.; URAI, M.; IWABUCHI, N.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Bacillus tryoxylicola* sp. nov., xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 61-66, 2010.
- AFONSO, L. C. Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação mestrado engenharia**. Universidade de São Paulo. 2012.
- AQUINO, A.C.M.M., JORGE, J.A., TERENCEZI, H.F. & POLIZELI, M.L.T.M. Thermostable glucose-tolerant glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* 15.1. **Folia Microbiologica**, Vol. 45 (6), pp. 11-16. (2001).
- ALBUQUERQUE, U. S. Detecção de enzimas hidrolíticas em bactérias mesofílicas isoladas em lodo de esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco. **Dissertação mestrado**. Universidade Católica de Pernambuco, 2009.
- ALMEIDA, R. P. C. Avaliação da produção de l-asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado. **Dissertação mestrado**, UNB, 2015.
- ALVES AP, BEHAR PR. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev AMRIGS**. 57(3):213-8, 2013.
- ANTÔNIO, R. V. *et. al.* Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **Rev. Técnico Científica (IFSC)**, v. 3, n. 1, 2012.
- ARAÚJO, M. C.; OLIVEIRA, M. B. M. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Rev. Ambient. Água** vol. 8 n. 3 Taubaté - Sep. / Dec. 2013.
- ASSIS, C. R.; ARAÚJO, M. C.; ARAUJO, A. V.; MARCEL, F.; MEDEIROS, A. C.; BEZERRA, R.; BEZERRA JUNIOR, L. **Riacho Cavouco: que Riacho é Esse?** 1 ed. Recife: Editora Universitaria, 2014, v., p. 33-50.
- BERGQVIST, Y.; KARLSSON, L.; FOHLLN, L.; Total protein determined in human breast milk by use of coomassie brilliant blue and centrifugal analysis. **Clin. Chem**, 35, 212, 1989.
- BOCCHINI, D. A. *et al.* Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.
- BASTOS, Cleber N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciososa*. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 286-288, June 2005.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Advance in applied Microbiology**. vol. 43, p. 141-194, 1997.

BASHA, N. S. REKHA, R. KOMALA, M. RUBY, S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase from Marine Actinomycetes by Solidstate and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, August. 8 (4): 353-360, 2009.

BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**. v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009.

BENARDINI, J. N.; SAWYER, J, K.; VENKATESWARAN, & NICHOLSON W. L. Esporo UV e resistência aceleração de endolithic *Bacillus pumilus* e *B. subtilis* isolados obtidos de Sonoran deserto basalto: implicações para lithopanspermia. **Astrobiology** 3: 709-717. 2003.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BIELANSKI A, BERGERON H, LAU PC, DEVENISH J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**; 46(2):146-52. 2003.

BOCCHINI, D. A. *et al.* Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.

BULÉON, A. Starch granules: structure and biosintesis. **Internacional journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CALADO, S. C. S.; SILVA, A. M. R. B.; SILVA, V. L., **Qualidade da Agua do Riacho Cavouco - Recife/PE**. XLII Congresso Brasileiro de Química. Rio de Janeiro. Resumos. p. 66, 2002.

CANNON, R et al. *Acetobacter xylinum*: an inquiry into cellulose biosynthesis. **The American Biology Teacher**, 62:6, 2000.

CARVALHO, E.; BELEM-COSTA, A.; PORTO, J. I. R. Identificação bioquímica de bactérias patogênicas isoladas de peixes ornamentais no estado do Amazonas. **Rev. bras. saúde prod. anim.**, Salvador, v. 16, n. 1, p. 170-178, Mar. 2015.

CASTELLANI. A Viability of some pathogenic in fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.** 42, 225-226, 1939.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Quim. Nova*, 27:146-56, 2004.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. BON, E. P. S.: In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Cap. 4p 71-94.2008.

_____, M. A. Z.; SALGADO, A. M. RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis, Rio de Janeiro: FAPERJ. EPUB, 2008.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**151, 369. 1985.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **RevBio - Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**. Vol.17 - nº 2 - 2011.

CORREA L, MARTINO MDV, SIQUEIRA I, PASTERNAK J, GALES AC, SILVA CV, et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infect Dis**. Feb; 13(80):1-8. 2013.

CORZO-DELGADO, J. E.; GOMEZ-MATEOS, J. M. *Stenotrophomonas maltophilia*, an increasingly important nosocomial pathogen. **Enferm infec microbiol clin**, v. 24, p. 1-3, 2006.

DAMÁSIO, A.R.L., SILVA, T.M., ALMEIDA, F.B.R., SQUINA, F., RIBEIRO, D.A. R., LEME, A.F.P., SEGATO, F., PRADE, R.A., JORGE, J.A., TEREZI, H.F. & POLIZELI, M.L.T.M. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry** Vol. 46, pp. 1236-1242, 2011.

DAVIS, B.J. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences. **Disc Electrophoresis**. II. Vol.28, 121, pp. 404-427, 1964.

DI BONAVENTURA, G. et al. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 52, p. 86-90, 2007.

DRZEWIECKA D.; SIDORCZYK, Z.; CHARAKTERYSTYKA *G. Proteus penneri* - warunkowych patogenów człowieka. **Post Mikrob** 44:113-126. 2005.

ESIOBU, N.; MOHAMMED, R.; ECHEVE RRY, A.; GREEN, M.; BONILLA, T.; HARTZ, A.; McCORQUODALE, D.; ROGERSON, A. The application of peptide nucleic acid probes for rapid detection and enumeration of eubacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in recreational beaches of S. Florida. **J. Microbiol. Methods**, v. 57, p. 157-162, 2004.

ESPINDULA J. C. & SANTOS A. C. 2004. Características Hidrogeológicas e Vulnerabilidade do Aquífero Freático na Área do Cemitério da Várzea – Recife/PE. XIII Congresso Brasileiro de Aguas Subterrâneas. **Revista Águas Subterrâneas**, v. 28, n. 1, São Paulo, Brasil, 2014.

FAGUNDES NETO U, SCHMITZ LG, SCALETSKY I. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: epidemiological and clinical features in Brasília, Brasil. **Int J Infect Dis.**; 1: 65-9. 1996.

FREITAS, Potencial da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (Wsmol) para tratamento de água contaminada. **Dissertação**. UFPE, 2015.

FREITAS, S.S; PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotricum gossypii* e promoção de crescimento de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) **Summa Phytopathologica**. v. 23, p.36-41, 1997.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. Bacillus cereus toxin production in cooked rice. **Food Microbiology**, 19:431–439, 2002.

FRY, S.M.; HUANG, J.S.; MILHOLLAND. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Biochemistry & Cell Biology**, vol.84, n.4, 1994.

GALES AC, REIS AO, JONES RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 183-190, 2001.

GAO Z, TSENG C. H, PEI Z, BLASER M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. **Proc Natl Acad Sci USA** 104: 2927–2932, 2007.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **J. Dairy. Sci.**, 86(E Suppl.): E78-E87, 2003.

GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GIANFREDA, A.; RAO, M. A.; SANNINO, F.; SACCOMANDI, F.; VIOLANTE, A. Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications. **Developments in Soil Science**, v.28B, p.301-327, 2002.

GOENAGA SANCHEZ, M. A. et al. Infección nosohusial por *Pseudomonas putida*. **An. Med. Interna (Madrid)**, Madrid, v. 22, n. 4, p. 51-52, abr. 2005.

GOYAL, MEENAKSHI ET AL. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 535-541, Sept. 2008.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

HALTRICH, DIETMAR; NIDETZKY, BERND; KULBE, KLAUS D.; STEINER, WALTER; ŽUPANČIČ, SILVIA. Production of fungal xylanases. **Biores. Technol.**, v.58, n. 2, p.137-161, 1996.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9(31), pp. 4836-4844, 2 August 2010.

HOWARD, C.; SCHWARTZ, J. Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** December, vol. 96 no. 6 2043-2048, 1968.

JAIN, YAN Y. Dehydratase mediated 1-propanol production in metabolically engineered *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact.** Nov 10; 10:97, 2011.

JONES, S. M.; YERLY, J.; HU, Y.; CERI, H.; MARTINUZZI, R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. **FEMS Microbiol Lett** 268:16-21. 2007.

JOSEPH, B., P. W. RAMTEKE, G. THOMAS, AND N. SHRIVASTAVA. 2007. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnol.** Mol. Biol. Rev. 2:39-48.

JULIET, L. C.; FERNANDEZ, V. A. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Rev Chilena Infectol**, v. 23, p. 247-8, 2006.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KEHINDE I.T. ENIOLA& ALBERT B. OLAYEMI .Linear Alkyl benzene Sulfonate tolerance in bacteria isolated from sediment of tropical water bodies polluted with detergents. **Rev. Trop.** (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 56 (4): 1595-1601, December 2008.

KAFKEWITZ, D.; GOODMAN, D. L-Asparaginase Production by the Rumen Anaerobe *Vibrio succinogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** January, vol. 27 no. 1 206-209, 1974.

KIM, SH., CHOI, N.S. & LEE, W.Y. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. **Analytical Biochemistry**, Vol. 263, pp. 115-116, (1998).

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC. **Diagnóstico Microbiológico**. 50 edição. MEDSI Editora, Rio de Janeiro, 2001.

KOZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potencial virulence factor of *Proteus bacilli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61: 65-89. 1997.

KUMARI, P.V. K. SANKAR, G. G. PRABHAKAR, T. L-asparaginase production and molecular identification of marine Streptomyces strain WS3/1. **Int J Pharm Biomed ReS.** 2(4), 244-249, 2011.

KUMAR, D.; BHALLA, Y. T. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 68:726–36, 2005.

LADEIRA, S. A. *et al.* Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Vol. 227, pp. 680-685. (1970).

LEITE, M. V. Fungos filamentosos do lodo de esgoto: impacto na microbiota fúngica e potencial enzimático. **Dissertação mestrado**. Universidade Católica de Pernambuco, 2009.

LOUREIRO, C. B. Purificação, conjugação e avaliação "in vitro" da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A). **Dissertação mestrado**. Universidade de São Paulo, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Biol. Chem**, 193, 265-275, 1951.

MARCHAIM, D., *et al.* Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species; emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrob. Agents Chemother.** n.52, p.1413-1418, 2008.

MALAJOVICH, M. A. **Biopolímeros: obtenção de celulose bacteriana**.. Disponível em: <<http://www.bteduc.bio.br>>. Acesso em: 17 fev 2016, 16:30:30.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Bactérias Diazotróficas: potencial para a biorremediação de ambientes impactados. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2012708, 2012.

MENDES, M. M. G. S.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. L. E.; SILVA, L. A. O.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Screening of Amazon Fungi for the Production of Hydrolytic Enzymes. **African Journal of Microbiology Research**, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MUKHERJEE, J.; MAJUMDAR, S.; SCHEPER, T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. February, Volume 53, **Issue 2**, pp 180-184, February, Volume 53, Issue 2, pp 180-184, 2000.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7^a edition. ASM Press, Washington, 1999.

MUSIL, I.; JENSEN, V.; SCHILLING, J.; ASHDOWN, B.; KENT, T. Case report *Enterobacter cloacae* infection of an expanded polytetrafluoroethylene femoral-popliteal bypass graft: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, 4:131. 2010.

NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evolution of L-Asparaginase in treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

NWUCHE, C. O.; UGOJI, E. O. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. **Journal Environmental Science and Technology**, v.5, n.2, p.409-414, 2008.

O'HARA, C.M.; BRENNER, F.W.; MILLER, J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin. Microbiol. Rev.** 13: 534-546. 2000.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, 26(4): 853-860, out-dez. 2006.

OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 401-404, 2010.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

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

PASSARINHO, A. T. P. Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene *XynA* de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos. **Dissertação mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais, 2014.

POLIZELI M. L. T. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; SILVA, T. M.; MALLER, A.; CABRAL H. Gel Electrophoresis for Investigating Enzymes with Biotechnological Application. *Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0457-5, **InTech**, (2012).

PUI CH, EVANS WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**; 354:166-78, 2006.

PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, F A. Caracterização Amostral das Bactérias do riacho Cavouco no município de Recife - PE. **Monografia de conclusão de curso**. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

RASER, K.J., POSNER, A. & WANG, K.K.W. Casein Zymography: A method to study μ -Calpain, m-Calpain, and their inhibitory agents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, nº 1, v. 319, pp. 211-216, 1995.

RAO, Y. K.; Lu, S.; Liu, B.; Tzeng, Y.; Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes **Biochem. Eng. J.**, 28, 57. 2006.

REDDY, L. V. A.; Wee, Y.; Yun, J.; Ryu, H.; Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. **Bioresour. Technol.**, 99, 2242. 2008.

ROCA, L. D. Á. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. Acta bioquím. clín. latinoam., **La Plata**, v. 48, n. 4, p. 465-474, dic. 2014.

ROWE, L.; HOWARD, G. T. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n.1, p. 33-40, 2002.

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

SAVITRI, N. A.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A Potent Antitumour Enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**. Vol 2, April, p184-194, 2003.

SILVA R, LAGO E.S, MERHEB .CW, MACCHIONE M.M, PARK Y.K, GOMES E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Braz. J. Microbiol.** 36:235-241, 2005.

_____, L. A. D. Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*. **Dissertação mestrado**. UFRS. 2008.

_____, L. S.; TRAVASSOS, L. Problemas ambientais urbanos: desafios para a elaboração de políticas públicas integradas. **Cadernos metrópole**, 19 pp. 27-47 10 sem. 2008.

STANIER, R.Y. **Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: Mundo dos Micróbios**. Cap.18, 1969.

SMITH, J. E. **Biotechnology**. Cambridge, 5th ed. 2009.

SOTERO-MARTINS, ADRIANA; BON, ELBA PINTO DA SILVA; CARVAJAL, ELVIRA. Asparaginase II-GFP fusion as a tool for studying the secretion of the enzyme under nitrogen starvation. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 373-377, Dec. 2003.

SHOWELL, M. S. Enzymes, detergent. *In*: FLICKINGER, M. C.; DREW, S.W (Eds.). Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. **Wiley & Sons**, New York, p. 958-971, 1999.

TEIXEIRA, M. F.S. Obtenção de espécies de *Arpergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. **Master of Science Thesis**, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil, 1994.

TIMMIS, K. N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. **Environ Microbiol.** Dec; 4 (12):779-81.2002.

THAKUR, S. Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. **International Journal of Scientific & Engineering Research** Volume 3, Issue 7, July-2012.

TORTORA, GERARD J. **Microbiologia**. 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOSA T, SANO R, YAMAMOTO K, NAKAMURA M, ANDO K. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. **Appl Microbiol.** Sep; 22(3): 387–392, 1971.

VERMA, N; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int. Res. J. Biological Sci.* Vol. 1(8), 88-92, December 2012.

VIIKARI, L.; KANTELINEM, A.; SUN QUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from idea to the industry. **FEMS Microbial Rev.**; Amsterdam, v. 13, p. 335-350, 1994.

WARREN, J.W. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In Mobley HLT and Warren JW (ed.), *Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington, D.C., p. 3–27, 1996.

WHITE P. A.; RASMUSSEN. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat. Res.** 410, p. 223-226. 1998.

ZHANG, C.; KIM, S. K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Mar. Drugs**, 8, 1920-1934; 2010.