

Microrganismos Isolados de Ambientes Aquáticos da Amazônia Produtores de Hidrolases de Interesse Industrial e Biotecnológico

Isolated Microorganisms of Amazon Aquatic Environments Producers of Hydrolases of Industrial and Biotechnological Interest

Ferdyanne Beatriz Sabóia Peixoto¹; Jean Charles da Cunha Peixoto²; Ana Beatriz Farias Saraiva³; Marelis Margarita Ruiz⁴; Ana Teresa Miranda Peixoto⁵; José Odair Pereira⁶; Spartaco Astolfi-Filho⁷

¹ferdyanne@gmail.com

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia- PPGBIONORTE

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus/AM – Brasil

²Departamento de Parasitologia/ Laboratório de Genética Bacteriana

²jean.metagenoma@gmail.com

²Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus/AM – Brasil

^{3,5}Ciências biológicas / Laboratório de Genética Bacteriana

³abfsaraiva@gmail.com

⁵anateresamirandapeixoto@hotmail.com

^{3,5}Universidade Federal do Amazonas - UFAM– Manaus/AM – Brasil

^{4,6}Faculdade de Ciências Agrárias – FCA

⁴joseodairpereira@yahoo.com.br

⁶marelisruiz7@hotmail.com

^{4,6}Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus/AM – Brasil

⁷spartaco.biotec@gmail.com

⁷Centro de Apoio Multidisciplinar -CAM

⁷Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus/AM – Brasil

Resumo

Enzimas são catalisadores biológicos responsáveis pela condução de reações bioquímicas fundamentais ao metabolismo e equilíbrio homeostático de células eucariontes e procariontes. Há uma demanda crescente de catalisadores biológicos em detrimento a catalisadores químicos, para utilização em processos de produção industrial, dado o alto grau de especificidade, melhor rendimento da reação e baixo custo final e também por sua baixa toxicidade. O objetivo deste estudo foi realizar uma busca direcionada de produção de hidrolases – amilases, proteases, lipases e celulases, por isolados microbianos de ambientes aquáticos do entorno da Província Petrolífera de Coari – AM. Foram empregados meios de cultivo contendo substratos específicos que estimularam a expressão das enzimas – alvo. Os resultados foram obtidos mediante leitura dos halos de degradação em torno das colônias microbianas crescidas em placas. Os Índices Enzimáticos (IE) foram estabelecidos pela medida do diâmetro médio do halo de degradação dividido pelo diâmetro médio da colônia microbiana. Do total de 39 isolados microbianos,

bactérias e leveduras, obteve-se em percentuais, para atividade lipolítica, 61,53%, com IE máximo entre 2,0 e 6,98; para atividade amilolítica, 64,10% com IE máximo entre 2,0 e 2,5; atividade enzimática para celulase em 35,89% dos isolados, com IE entre 2,0 e 3,5; e finalmente, atividade de protease foi observada em 46,15% dos isolados, apresentando IE máximo entre 2,0 e 8,15. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios com destaque para as lipases e proteases, encorajando análises futuras visando sua utilização em processos industriais.

Palavras-chave: Prospecção; Microrganismos; Lipase; Protease; Amilase; Celulase.

Abstract

Enzymes are biological catalysts responsible for the conduction of biochemical reactions fundamental to the metabolism and homeostatic balance of eukaryotic and prokaryotic cells. There is a growing demand for biological catalysts rather than chemical catalysts for use in industrial production processes, given the high degree of specificity, better reaction yields and lower final cost, and also because of their low toxicity. The objective of this study was to conduct a targeted search for the production of hydrolases - amylases, proteases, lipases and cellulases, by microbial isolates from aquatic environments in the vicinity of the Coari - AM Petroleum Province. Culture media containing specific substrates were used which stimulated the expression of the target enzymes. The results were obtained by reading the degradation halos around the microbial colonies grown in plates. The Enzymatic Indices (EI) were established by measuring the mean diameter of the degradation halo divided by the mean diameter of the microbial colony. Of the total of 39 microbial isolates, bacteria and yeasts, 61.53% were obtained in percentage, for lipolytic activity, with a maximum EI between 2.0 and 6.98; For amylolytic activity, 64.10% with maximum EI between 2.0 and 2.5; Enzymatic activity for cellulase in 35.89% of the isolates, with EI between 2.0 and 3.5; And finally, protease activity was observed in 46.15% of the isolates, with a maximum IE between 2.0 and 8.15. The results obtained were very satisfactory with emphasis on the lipases and proteases, encouraging future analyzes aiming their use in industrial processes.

Key-words: Prospecting; Microorganisms; Lipase; Protease; Amylase; Cellulase.

1. Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos que atuam em diversos processos bioquímicos celulares (LITTLECHILD *et al.*, 2015). São utilizadas em diferentes setores da economia mundial, tendo uma vasta aplicação na biotransformação de diferentes substratos, agregando valor a produtos têxteis, alimentícios, medicamentos, cosméticos, e produtos de uso científico e biotecnológico (SINGH *et al.*, 2019; ORLANDELLI *et al.*, 2012). As enzimas de origem microbiana têm sido amplamente utilizadas em diferentes setores industriais, devido à facilidade de manipulação genética, estabilidade, possibilidade de produção em larga escala, diminuição no tempo e redução dos custos de produção (SINGH *et al.*, 2019; LITTLECHILD *et al.*, 2015; MAKI *et al.*, 2009; OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Os microrganismos representam a principal fonte de enzimas, devido sua distribuição ubíqua nos ambientes naturais, e facilidade de cultivo, possibilitando melhorar propriedades desejáveis,

ajustando rendimento e concomitante taxa de crescimento (THAPA *et al.*, 2019). As bactérias são responsáveis pela produção de 30% das enzimas industriais, enquanto que fungos respondem por mais de 50% (THAPA *et al.*, 2019).

Os avanços nos processos de purificação e recuperação de proteínas com o auxílio da biotecnologia tem aprimorado a tecnologia enzimática, visando à melhoria dos processos envolvendo biocatalisadores (ORLANDELLI *et al.*, 2012). No cenário atual são conhecidas aproximadamente 4000 enzimas, das quais cerca de 200 são comercializadas, e 20 são produzidas em larga escala. Dentre as enzimas comercializadas, 75% são hidrolases, e desse total, 90% são de origem microbiana (LI *et al.*, 2012; MESSIAS *et al.*, 2011). A demanda crescente do setor industrial por catalisadores biológicos com propriedades que se adéquem a condições específicas de processos industriais, tem aumentado extensivamente a busca por microrganismos produtores de enzimas em todo o mundo (MALAJOVICH, 2012; MONTEIRO & SILVA, 2009).

A maioria das enzimas microbianas de importância industrial pertence à classe das hidrolases (SINGH *et al.*, 2019; THAPA *et al.*, 2019). As lipases, proteases, amilases e celulases são enzimas hidrolíticas de grande interesse comercial. As proteases estão em primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas utilizadas pela indústria, seguidas pelas amilases (THAPA *et al.*, 2019; ORLANDELLI *et al.*, 2012;). As proteases respondem por aproximadamente 40% das vendas totais, e as amilases por 25 a 33% da produção mundial de enzimas (TIWARI, 2014; CARVALHO, 2008; PANDEY *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2003). As lipases, classe de enzimas de destacada relevância para a indústria de detergentes, são empregadas, ainda, nas áreas farmacêutica, alimentícia, de laticínios, de papel, de couro, produtos químicos, tratamento de águas residuais, dentre outras (SINGH *et al.*, 2019; MASOMIAN, 2016; SACCO, 2013). Finalmente, as celulases, grupo de enzimas sintetizadas por diferentes microrganismos principalmente fungos e bactérias, são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, de alimentos, têxtil, de detergentes, de couro e na produção de biocombustível como o bioetanol, utilizando substratos lignocelulósicos (SINGH *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2011). Contextualmente, esse uso crescente deve-se à facilidade de obtenção, por técnicas de melhoramento genético, levando vantagem em comparação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético, mais amistosos ao meio ambiente e maior velocidade de reação, e redução dos custos de laboratório e de equipamentos. Nesse contexto, o foco central deste trabalho foi estabelecer uma busca direcionada de enzimas hidrolases, de origem microbiana, de ambientes aquáticos amazônicos pré-selecionados em meio de cultivo contendo petróleo como única fonte de carbono.

2. Material e Métodos

2.1 Atividade enzimática dos isolados microbianos

Os ensaios laboratoriais utilizados para estimular a expressão de enzimas, pelos isolados microbianos, foram conduzidos em meios específicos (em triplicata) para produção de lipase, protease, amilase e celulase respectivamente.

2.1.1 Área de estudo

A área de estudo compreende a base de operações da Petrobrás Geólogo Pedro de Moura localizada Município de Coari/AM - Brasil, situado a 653 km em linha reta a sudoeste de Manaus (4°30'S/64°30'W), (PETROBRAS, 2008).

2.1.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras de água foram coletadas no dique de efluente localizado no entorno da base petrolífera de Urucu. O local de estudo corresponde ao dique de efluente (S1), o dique é uma lagoa artificial, onde são descartados resíduos de petróleo processados na base, sua localização geográfica georeferenciada corresponde a (S 04°51'50.4" / W 065°18'00.3"). A coleta foi realizada a margem da lagoa a uma profundidade de 50 cm e no meio da lagoa a uma profundidade de 2 metros. O segundo sítio de coleta trata-se do Igarapé natural (S2), sem contato com o dique de efluente, e sem indícios de contaminação/poluição (S 04°51'40.4" / W 065°17'52.7"). A água foi coletada a margem do igarapé a uma profundidade de 20 cm. O terceiro sítio de coleta corresponde ao Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente (S 04°51'40.9" / W 065°17'50.4"). A coleta foi realizada a 20 cm de profundidade. Em seguida, as amostras de água foram acondicionadas em garrafas de vidro esterilizadas, e mantidas refrigeradas em caixa térmicas durante o traslado da Província Petrolífera de Urucu/ Coari até o seu processamento no laboratório de Tecnologia do DNA recombinante na Universidade Federal do Amazonas-UFAM em Manaus.

2.1.3 Isolamento

As amostras de água foram enriquecidas em meio mineral *Buschnell Haas* (BH) (DIFCO™), 90 ml, e 1% de petróleo cru como única fonte de carbono, utilizando *Erlenmeyers* de 250 mL, tendo-se inoculado 10 mL de água, de cada sítio amostrado, em foram incubadas a 30⁰ C, sob agitação de 180 rpm/min em *shaker* rotativo durante 21 dias. Os microrganismos foram isolados em meio mínimo BH ágar contendo petróleo previamente esterilizado pelo método de filtração em membranas milipore 0,22µm. As cepas selecionadas foram cultivadas em meio ágar triptonsoja (TSA - DIFCO™). Após o enriquecimento foi realizadas diluição seriada com as amostras de

água, de 10^{-1} a 10^{-5} em placas contendo ágar triptonsoja (TSA). A contagem das UFC's totais, foi feita distribuindo-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo meio TSA. As placas foram incubadas a 30 °C e a contagem foi realizada após 24 horas.

2. 2 Atividade enzimática dos isolados microbianos

Os ensaios laboratoriais utilizados para estimular a expressão de enzimas, pelos isolados microbianos, foram conduzidos em meios específicos (em triplicata) para produção de lipase, protease, amilase e celulase respectivamente.

2. 2. 1 Determinação da atividade Lipolítica - Para testar a habilidade dos isolados em produzir lipase em meio sólido, as colônias isoladas em cultivo puro foram transferidas para placas contendo (0,002 g/L de rodamina B, 2% de azeite de oliva, 3 g/L de peptona, 2 g/L extrato de levedura, 2 g/L de fosfato de potássio monobásico, 2 g/L de cloreto de cálcio, 1 g/L de sulfato de magnésio, 18 g/L de ágar, 1% de tween 80). As placas foram incubadas por 48 horas em estufa B.O.D a 37°C. A atividade enzimática foi visualizada pela presença de um halo transparente em volta da colônia em contraste com o meio rosa.

2. 2. 2 Determinação da atividade Amilolítica - A produção de amilase foi avaliada em placas contendo meio comercial ágar amido (Himedia) com 8 g/L de amido de milho. Após 48 horas de incubação a 37 °C em estufa B.O.D, adicionou-se ao meio 50 mL de tintura de iodo o qual revelou um halo claro em volta da colônia indicando a atividade Amilolítica.

2. 2. 3 Determinação da atividade Proteolítica - A capacidade dos isolados microbianos em expressar protease foi avaliada em meio sólido contendo (2 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de leite desnatado, 2,5 g/L de gelatina, 15 g/L de ágar). Após 48 horas de incubação a 37 °C em estufa B.O.D, foram verificados os halos transparentes, em volta da colônia indicando a atividade proteolítica.

2. 2. 4 Determinação da atividade Celulolítica - A atividade celulolítica foi detectada em meio contendo (1% de carboximetilcelulose, 2,5 g/L de peptona, 2,5 g/L de NaCl, 1,25 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar), as placas foram incubadas a 37 °C em estufa B.O.D. Após 24 horas foi adicionado 5.0 mL de solução reveladora de *congo red* a 0,25% (2,5 g/L), a atividade enzimática foi observada pelo halo claro em volta da colônia.

2. 2. 5 Avaliação do índice enzimático dos isolados (IE) - A atividade enzimática dos microrganismos isolados nos meios específicos para produção de lipase, protease, amilase e celulase, foi determinada pelo índice enzimático (IE), onde, diâmetro médio do halo de degradação foi dividido pelo diâmetro médio da colônia conforme a equação abaixo. O resultado é considerado satisfatório quando o IE for = ou < 2.0 o que indica atividade enzimática (SILVA, *et al.*, 2015; FLORENCIO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 1998).

Equação 1:
$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}} = IE(\text{mm})$$

2. 2. 6 Análise estatística - As atividades enzimáticas dos microrganismos foram analisadas estatisticamente utilizando um delineamento experimental casualizado, com três repetições, os índices obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), onde foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise foi realizada no programa *Assistat 7.7 beta*, pacote de assistência estatística, desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de S. de A.S. e Silva da Universidade Federal de Campinas Grande (SILVA & AZEVEDO, 2009).

3. Resultados e discussão

Foram isolados 39 microrganismos, sendo 17 cepas do dique de efluente; 12 do Igarapé natural e 10 do Igarapé após a confluência com o efluente. A estimativa das populações microbianas foi realizada com base no NMP em UFC's/mL. Os resultados para os três ambientes estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Número de UFC's por ponto de coleta

Código	Pontos de coleta	Profundidade	UFC's/mL
S1	Dique de efluente	50 cm	6400x10 ²
		2 m	495x10 ²
S2	Igarapé natural	20 cm	127x10 ²
S3	Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente	20 cm	1950x10 ²

Dos 39 isolados microbianos analisados pelo método de Gram, 3 foram identificados como leveduras, com propriedade tintorial Gram-positiva; 22 como Bacilos Gram-negativos; e 14 são Bacilos Gram-positivos (Tabela 2).

A expressão da atividade enzimática dos isolados foi avaliada em meios específicos para detecção da produção de amilase, celulase, protease e lipase (tabela 2). A atividade enzimática foi determinada pela medida do raio em meio sólido, onde o índice enzimático (IE) foi considerado satisfatório quando se apresentou igual ou maior que 2.0 mm conforme previamente descrito em

outros estudos (SILVA, *et al.*, 2015; FLORENCIO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 1998). Considerando as médias dos índices enzimáticos (IE) de cada isolado obtidos neste estudo, verifica-se que não houve diferenças significativas ao nível de $p < 0.01$ (tabelas 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2 – Identificação morfotintorial e resultados dos testes enzimáticos dos microrganismos isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3)

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO MORFOTINTORIAL		RESULTADOS DOS TESTES ENZIMÁTICOS			
	Morfologia	Propriedade tintorial	Amilase	Lipase	Protease	Celulase
S1-01	Bacilo	Gram – negativo	+	+	+	+
S1-02	Levedura	Gram – positivo	+	-	+	-
S1-03	Levedura	Gram – positivo	+	-	-	-
S1-04	Levedura	Gram – positivo	-	+	+	-
S1-05	Bacilo	Gram – positivo	+	+	-	+
S1-06	Bacilo	Gram – positivo	+	+	-	+
S1-07	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	+
S1-08	Bacilo	Gram – negativo	-	-	-	-
S1-09	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	-
S1-10	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	+
S1-11	Bacilo	Gram – negativo	-	-	-	-
S1-12	Bacilo	Gram – positivo	-	+	+	-
S1-13	Bacilo	Gram – negativo	-	+	-	-
S1-14	Bacilo	Gram – negativo	-	-	-	-
S1-15	Bacilo	Gram – negativo	+	-	-	-
S1-16	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	+
S1-17	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	-
S2-01	Bacilo	Gram – negativo	-	-	-	-
S2-02	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	-
S2-03	Bacilo	Gram – positivo	+	+	+	+
S2-04	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	-
S2-05	Bacilo	Gram – negativo	-	+	+	-
S2-06	Bacilo	Gram – positivo	-	+	-	+
S2-07	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	+
S2-08	Bacilo	Gram – negativo	+	+	+	-
S2-09	Bacilo	Gram – negativo	-	+	+	-
S2-10	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	-
S2-11	Bacilo	Gram – negativo	-	+	-	-
S2-12	Bacilo	Gram – negativo	+	+	+	-
S3-01	Bacilo	Gram – negativo	-	+	+	+
S3-02	Bacilo	Gram – negativo	-	+	-	-
S3-03	Bacilo	Gram – positivo	+	-	-	-
S3-04	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	-
S3-05	Bacilo	Gram – positivo	+	+	-	+
S3-06	Bacilo	Gram – negativo	-	+	-	-
S3-07	Bacilo	Gram – negativo	+	+	-	-
S3-08	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	+
S3-09	Bacilo	Gram – negativo	+	+	+	+
S3-10	Bacilo	Gram – positivo	+	-	+	+

No teste de atividade da lipase (pH entre 8,0 e 8,5) 24 isolados microbianos, o equivalente a 61,53% do total de isolados (tabela 7) mostraram-se positivos, sendo 7 isolados do Dique de efluente, 11 do Igarapé natural e 6 do igarapé após confluência com o vertedouro. Quanto à morfologia, 17 são Bacilos Gram – negativos; 6 são Bacilos Gram – positivos e 1 levedura. Os

índices enzimáticos variaram entre **2,0 e 6,98mm** (tabela 3). Se levamos em conta o IE como parâmetro para avaliar o potencial de utilização das lipases, nota-se que o maior índice de atividade lipolítica, obtido neste trabalho, representa quase o dobro quando comparado ao descrito por Carrim *et al.* (2006), IE de 3,7 (22,22%); é três vezes maior quando confrontado a Oliveira, *et al.*, (2006), IE de 2,0 (4,9%); e quase 3 vezes em relação aos IE obtidos por Stamford *et al.*, (1998), IE máximo de 2,89 (4,41%). O percentual dos microrganismos ativos para expressão de lipases no presente estudo extrapola em magnitude de mais de 10 vezes, os isolados microbianos descritos nos trabalhos aqui citados – percentual entre parênteses. Essa diferença elevada pode ser explicada pelo fato de que lipídios são dispersos de modo mais facilitado em meio aquoso do que em solos, aumentando o contato entre microrganismos produtores de lipases e substrato lipídico. Os isolados microbianos obtidos neste estudo demonstraram elevado potencial de produção de lipase, encorajando a utilização dos mesmos em processos de produção de lipases para uso industrial.

Tabela 3 – Análise estatística semiquantitativa da produção de lipase

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Lipase		
S1-01	1.8fg	2.00	2.00	1.50
S1-04	3.0c	3.12	3.00	3.00
S1-05	2.6d	2.50	2.60	2.70
S1-06	2.06ef	2.00	2.00	2.20
S1-09	1.5gh	1.50	1.50	1.50
S1-12	1.5gh	1.40	1.50	1.60
S1-13	2.08ef	2.25	2.00	2.00
S2-02	0.58i	.66	.60	.50
S2-03	1.5gh	1.50	1.50	1.70
S2-04	2.6d	2.50	2.50	2.80
S2-05	2.63d	2.66	2.60	2.70
S2-06	1.53gh	1.50	1.60	1.50
S2-07	2.5d	2.50	2.40	2.60
S2-08	2.0ef	2.00	2.00	2.00
S2-09	0.567i	.50	.50	.70
S2-10	5.0b	5.00	5.00	5.00
S2-11	0.64i	.66	.60	.66
S2-12	2.31de	2.33	2.30	2.30
S3-01	6.8a	6.98	6.50	6.92
S3-02	0.53i	.50	.60	.50
S3-05	1.31h	1.33	1.30	1.30
S3-06	1.62gh	1.66	1.60	1.60
S3-07	2.0ef	2.00	2.00	2.00
S3-09	2.08ef	2.14	2.10	2.00

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.01$) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.35

A produção de amilase foi expressa por um total de 25 cepas microbianas (64,10%) sendo, 11 do dique de efluente, 7 do igarapé natural e 7 do igarapé após o vertedouro (tabela 7). Entre os isolados microbianos, 12 são Bacilos Gram – positivos, 2 leveduras com propriedade tintorial Gram – positiva e 11 Bacilos Gram – negativos.

Tabela 4 – Análise estatística semiquantitativa da produção de amilase

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Amilase
S1-01	1.6 cd	1.50 1.66 1.66
S1-02	1.9abc	1.75 2.00 2.00
S1-03	1.55cd	1.66 1.50 1.50
S1-05	1.4d	1.20 1.50 1.50
S1-06	2.16a	2.50 2.00 2.00
S1-07	1.43d	1.30 1.50 1.50
S1-09	1.01e	1.04 1.00 1.00
S1-10	0.54f	.62 .50 .50
S1-15	1.56cd	1.50 1.60 1.60
S1-16	1.66bcd	1.60 1.70 1.70
S1-17	1.56cd	1.70 1.50 1.50
S2-02	1.43d	1.50 1.40 1.40
S2-03	1.44d	1.33 1.50 1.50
S2-04	1.99ab	1.99 2.00 2.00
S2-07	0.53f	.60 .50 .50
S2-08	0.57f	.52 .60 .60
S2-10	1.5d	1.52 1.50 1.50
S2-12	1.55cd	1.66 1.50 1.50
S3-03	1.44d	1.33 1.50 1.50
S3-04	2.0ab	2.00 2.00 2.00
S3-05	1.4d	1.25 1.50 1.50
S3-07	2.16a	2.50 2.00 2.00
S3-08	1.5d	1.50 1.50 1.50
S3-09	1.4d	1.20 1.50 1.50
S3-10	1.55cd	1.66 1.50 1.50

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (p < 0.01) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.38

Os maiores IE expressos ficaram entre **2,0 e 2,5 mm** (tabela 4), demonstrando maior atividade, e percentual de isolados superior quando comparado aos resultados obtidos por Oliveira *et al.*, (2007), que avaliaram a produção de amilase por isolados de rizóbios, e observaram que dos 19 isolados testados em meio sólido YMA modificado, 7 (36,8%) expressaram atividade com índice de 2,1 mm. No entanto, o maior IE de atividade amilolítica foi inferior ao descrito em Baratto *et al.*, (2011), os quais isolaram microrganismos a partir de fontes agroindustriais e solos, com atividade

amilolítica variando entre 1,0 e 4,19 mm, no entanto o percentual de isolados amilolíticos, obtidos por esses autores foi menor (51,4%) em relação ao nossos achados.

A atividade celulolítica foi expressa por 14 (35,89%) isolados, sendo 6 do Dique de efluente; 3 do Igarapé natural e 5 do Igarapé após o vertedouro (tabela 7). São eles, 10 Bacilos Gram – positivos e 4 Bacilos Gram – negativos. Os maiores índices enzimáticos expressos variaram entre **2,0 e 3.51mm** (tabela 5). Não obstante os índices enzimáticos obtidos para atividade celulolítica estarem dentro do índice mínimo, no entanto, estão abaixo daqueles descritos por Queiroz *et al.*, (2002), os quais reportaram variação de IE entre 5,0 e 31,7 mm para atividade celulolítica e de lacases em 27 cepas bacterianas isoladas de efluente de fábrica de papel, e desse total 63% degradaram celulose. No entanto, isso pode ser explicado pelo fato de que a amostra foi obtida de efluente de indústria de celulose, onde os microrganismos estão submetidos a uma única fonte de carbono, conferindo alto grau de especialização frente a ambiente saturado por resíduos de celulose.

Tabela 5 – Análise estatística semiquantitativa da produção de celulase

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Celulase
S1-01	2.0cd	2.00 2.00 2.00
S1-05	2.2c	2.40 2.00 2.20
S1-06	1.3e	1.34 1.30 1.30
S1-07	2.0cd	2.00 2.00 2.00
S1-10	0.91f	.84 1.00 .90
S1-16	0.84fg	.73 1.00 .80
S2-03	2.6b	2.74 2.50 2.70
S2-06	0.37hi	.33 .50 .30
S2-07	1.7d	1.71 1.70 1.70
S3-01	3.43a	3.51 3.50 3.30
S3-05	0.58gh	.66 .60 .50
S3-08	0.2i	.20 .30 .10
S3-09	0.52h	.57 .50 .50
S3-10	1.69d	1.77 1.80 1.50

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (p < 0.01) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.31

Foram selecionados 18 (46,15 %) isolados microbianos com atividade proteolítica (pH 7,0) sendo 8 do Dique de efluente, 5 do Igarapé natural e 5 do igarapé após o vertedouro (tabela 7). Desses, 9 são Bacilos Gram – positivos; 7 são Bacilos Gram – negativos e 2 leveduras. Os melhores índices enzimáticos foram registrados entre **2,0 e 8,15 mm** (tabela 6). Comparando com os maiores IE para atividade proteolítica e percentual dos isolados – relacionados entre parênteses, descritos em Bueno *et al.*, (2009), IE entre 0,75 e 0,92 (22,2%); Oliveira, *et al.*, (2006), IE entre 2,0 e 6,7 (35,9%); e Stamford *et al.*, (1998), IE entre 1,30 e 4,0 (5,8%), a descoberta dessas bactérias

produtoras de protease, abre perspectiva de serem realizadas pesquisas visando determinar o potencial desses microrganismos para uso em indústrias.

Tabela 6 – Análise estatística semiquantitativa da produção de protease

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Protease		
S1-01	1.5e	1.50	1.50	1.50
S1-02	1.66e	1.60	1.60	1.80
S1-04	1.9d	1.80	2.00	2.00
S1-07	1.62e	1.66	1.60	1.60
S1-10	1.56e	1.50	1.50	1.70
S1-12	0.45g	.46	.40	.50
S1-16	3.0b	3.00	3.00	3.00
S1-17	1.5e	1.50	1.50	1.50
S2-03	2.5c	2.33	2.50	2.70
S2-05	1.06f	1.00	1.00	1.20
S2-08	2.0d	2.00	2.00	2.00
S2-09	2.5c	2.50	2.50	2.50
S2-12	2.08d	2.06	2.00	2.20
S3-01	8.08a	8.15	8.10	8.00
S3-04	0.097h	.09	.10	.10
S3-08	0.59g	.57	.60	.60
S3-09	1.5e	1.50	1.50	1.50
S3-10	0.08h	.05	.10	.10

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ($p < 0.01$) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.23.

Os isolados que se destacaram pela habilidade múltipla e versatilidade foram **S1-01**, **S2-03**, **S3-09** os quais apresentaram atividade enzimática para os testes de celulase, amilase, lipase e protease respectivamente. As cepas, **S1-05**, **S1-06**, **S2-07** e **S3-05** expressaram atividade enzimática para amilase, lipase e celulase. As amostras **S1-07**, **S1-10**, **S1-16**, **S3-08** e **S3-10**, apresentaram atividade positiva quando submetidas aos testes de produção de amilase, protease e celulase. Os isolados, **S2-08**, **S2-12**, hidrolisam, amido, lipídio e proteínas. A amostra **S3-01** foi positiva nos testes para lipase, protease e celulase. A atividade enzimática expressa pelos 39 isolados estão apresentadas na (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade enzimática expressa por isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3)

Testes enzimáticos	Isolados positivos / total de isolados S1	Isolados positivos / total de isolados S2	Isolados positivos / total de isolados S3	Nº de isolados positivos/ total de isolados	Total de isolados positivos (%)
Amilase	11/17	7/12	7/10	25/39	64.10%
Lipase	7/17	11/12	6/10	24/39	61.53%
Protease	8/17	5/12	5/10	18/39	46.15%
Celulase	6/17	3/12	5/10	14/39	35.89%

4. Conclusão

Considerando as condições experimentais empregadas neste estudo, pode-se verificar um percentual elevado de isolados microbianos que expressaram atividade enzimática para amilases, proteases, lipases, e celulases, com IE superior à média relatada em trabalhos anteriores, o que demonstra elevada capacidade catalítica. Destacam-se neste estudo a atividade das lipases e proteases, que extrapolaram IE descritos na literatura científica recente. Testes de estabilidade de pH, temperatura e atividade catalítica deverão ser conduzidos para a seleção visando a utilização em processos industriais e biotecnológicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) / Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte).

Referências

- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B. de; LOCATELLI, G. O. **Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil.** Evidência, Joacaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.
- BUENO, C. J.; FISCHER, I. H.; ROSA, D D.; FURTADO, E. L.. **Produção de enzimas extracelulares por Fusarium solani de maracujazeiro amarelo.** Tropical Plant Pathology 34 (5) September - October 2009.
- CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; GONÇALVES, J. D.V.. **Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo).** Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.49, n. 3 : pp. 353-359m, May 2006.

- CARVALHO, R. V. **Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima.** Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 28, n. 2, p. 380-386. 2008.
- FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. **Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains.** *Enzyme Research*, p.1-7, 2012.
- GUPTA .R., KHASA Y.P., & KUHAD R.C. **Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials.** *Carbohydrate Polymers* 84: 1103-1109. 2011.
- GUPTA, R.; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -amylases: a biotechnological perspective.** *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1599-1616. 2003.
- LI, S. , YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. **Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering.** *Computational and structural biotechnology Jornal*. Volume No: 2, Issue: 3, September 2012.
- LITTLECHILD, J. A. **ReviewArticle: Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts.** Hindawi Publishing Corporation *Archaea*. 2015. vol. pag. 10. 2015
- MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass.** *Int. J. Biol. Sci.* vol.5, n. 5, p. 500-516. 2009.
- MASOMIAN, M. et al. **Analysis of Comparative Sequence and Genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial Lipases.** *PLoS ONE*. vol. 11, n. 3, pag. 20. 2016.
- MALAJOVICH M, A. **Biotecnologia 2011.** Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- MESSIAS, J. M.; COSTA B. Z. da; LIMA, V. M. G. de; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas.** *Semina: Ciências Exatas e tecnológicas, Londrina*, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática.** *Revista Processos Químicos, Goiânia*. 2009.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. **Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez.** *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26 (1): 204-210, jan-mar. 2006.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. A.; JÚNIOR, A. F. C.. **Enzimas Hidrolíticas Extracelulares de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil.** *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26 (4): 853-860, out.-dez. 2006.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology.** New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760p. 2005.
- PETROBRAS. **A saga do petróleo na Amazônia. O desafio de produzir ouro negro na Amazônia.** *Manaus. Luz Comunicação*, Rio de Janeiro, 36 p. 2008.

QUEIROZ, G. O, JORDÃO, R. C. C., SALGUEIRO, A. A. **Seleção de microrganismos produtores de celulases e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel.** Revista Química & Tecnologia, v.1, n.1, p.7-10, 2002.

SACCO, L. P. **Isolamento de Bactérias Produtoras de Enzimas de Interesse em Processos Biotecnológicos.** 2013. 57 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2013.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S.C.S. **Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 2026. 2015.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN GRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGH, R. S.; SINGH, T., PANDEY, A. **Microbial Enzymes—An Overview.** In: SINGH, R. A.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Advances in Enzyme Technology. 1ª Edição. Elsevier. Pg 1- 40. 2019.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade Enzimática de Microrganismos isolados do Jacatupé (Pachyrhizus erosus L. Urban).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, p. 382-385, 1998.

THAPA, S. et al. **Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives.** Molecular Biotechnology. Pg 1-23, June 2019.

TIWARI, S. et al. **Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Amylase from Solvent Tolerant Bacillus tequilensis RG-01: Thermostable and Surfactant Resistant.** The Scientific World Journal. Pg 11, 2014.

Recebido em: 20/07/2017

Aprovado em: 24/10/2020