

MARIA VANESSA PONTES DA COSTA ESPÍNOLA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS
TERMOFÍLICAS E TERMOTOLERANTES ISOLADAS DO SOLO DA CAATINGA
DO CARIRI PARAIBANO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa

2020

MARIA VANESSA PONTES DA COSTA ESPÍNOLA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS
TERMOFÍLICAS E TERMOTOLERANTES ISOLADAS DO SOLO DA CAATINGA
DO CARIRI PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof. Dra. Krystyna Gorlach-Lira

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

E77i Espinola, Maria Vanessa Pontes da Costa.
Identificação e caracterização fisiológica de bactérias termofílicas e termotolerantes isoladas do solo da caatinga do cariri paraibano / Maria Vanessa Pontes da Costa Espinola. - João Pessoa, 2020.
93 f. : il.

Orientação: Krystyna Gorlach-Lira.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Identificação molecular. 2. Enzimas extracelulares.
3. Bacillus. I. Gorlach-Lira, Krystyna. II. Título.

UFPB/CCEN

MARIA VANESSA PONTES DA COSTA ESPÍNOLA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS
TERMOFÍLICAS E TERMOTOLERANTES ISOLADAS DO SOLO DA CAATINGA
DO CARIRI PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

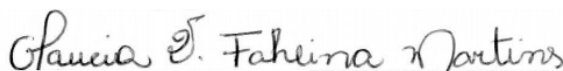
Data: 17/04/2020

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA:



(Orientadora) Profa. Dra. Krystyna Gorlach-Lira, Universidade Federal da Paraíba



(Avaliadora) Profa. Dra. Gláucia Verissimo Faheina Martins, Universidade Federal de Campina Grande



(Avaliador) Me. Bruno Oliveira de Veras, Universidade Federal de Pernambuco

(Suplente) Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida, Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho à minha família e amigos que sempre me encorajaram em tudo.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a. Dr^a. Krystyna Gorlach-Lira, por aceitar me orientar neste trabalho, por sempre me acolher tão bem em seu laboratório e por ser uma pessoa maravilhosa.

A todos os meus amigos do BIOMICRO: Jalcinês, Lucas, Samuel, Fernanda, Rádamis, Thiago, Jackelly, Luana, Malu, Brenda, Iasmin e Maria Helena, por alegrarem minhas manhãs e sempre tirarem todas as minhas dúvidas.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, do Centro de Biotecnologia e da Coordenação de Ciências Biológicas que direta ou indiretamente me auxiliaram com este trabalho: D. Alda, Gláucia, Regina, Dione, S. Bosco, TCris e Vítor.

Aos meus pais, por todo o apoio até hoje e ao Vítor, por todo o amor, paciência, ajuda e companheirismo.

À Luiz e Edvaldo, meus grandes amigos de graduação, pelo apoio nas partes mais difíceis da graduação e do TCC, e também pelos momentos de diversão compartilhados. À Jamilah, pelo apoio nos surtos e estresses do TCC e da graduação no geral e por me enviar imagens de bichinhos nos momentos de necessidade. À Vinícius e Louise, meus melhores amigos, pela compreensão com os meus momentos de sumiço.

Às meninas do Othala: Gaby, Helô, Sanny, Lucinha, Fê, Tatá e Kace, por todos os domingos de manhã, todas as terças à tarde e todas as aventuras, desabafos, surtos coletivos e apoio que vocês me proporcionaram. Fico muito feliz de ser amiga de vocês, obrigada por melhorarem meus dias e manterem minha sanidade.

A todos os meus amigos de RPG, pela amizade, por me mostrarem mundos novos e por todos os momentos de irreverência proporcionados pelos acertos e erros críticos. Aos colegas de kung fu, por todos os ensinamentos e momentos de desestresse.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Evolutiva Paulo Leminski, vocês foram fundamentais para a minha formação inicial.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho direta ou indiretamente, Obrigado.

“Da forma que vejo, toda vida é uma pilha de coisas boas e ruins. As boas nem sempre amenizam as coisas ruins, assim como as ruins nem sempre estragam as boas ou as tornam menos importantes.”

11º Doutor (Doctor Who)

RESUMO

Os microrganismos provenientes de ambientes extremos, tais como caatinga, adaptados a baixa atividade de água e altas temperaturas, podem ser uma fonte de enzimas com as características úteis para uso biotecnológico e industrial. Com isto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade, produção de enzimas extracelulares e algumas características fisiológicas de bactérias isoladas do solo da caatinga da região de São João do Cariri, Paraíba. A identificação e análise filogenética dos isolados baseou-se nos métodos moleculares, como extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene DNAr 16S, e análise das sequências utilizando as ferramentas de bioinformática. O crescimento de bactérias foi avaliado em faixa de temperatura de 25°C a 70 °C. Foi feita a análise da produção de enzimas extracelulares utilizando meios de cultura com os substratos específicos carboximetilcelulose, pectina cítrica, amido, gelatina, óleo vegetal residual e quitina para detecção das enzimas celulasas, pectinases, amilases, proteases, lipases e quitinases, respectivamente. Foi determinada a capacidade dos isolados bacterianos de utilizarem açúcares (celobiose, frutose, galactose, lactose, manose, rafinose, xilose e salicilina) e sais orgânicos (succinato de sódio e citrato de sódio) como fonte de carbono. Constatou-se que os 28 isolados testados pertenceram ao gênero *Bacillus* do filo *Firmicutes*, sendo que 25 isolados apresentaram a similaridade com a espécie *B. subtilis* e três à *B. tequilensis*. Na base de faixa de temperaturas de crescimento, 25 dos isolados foram classificados como termotolerantes e 3 isolados como termofílicos. Todos os isolados produziram pelo menos dois tipos de enzimas extracelulares, sendo que as celulasas, proteases e lipases foram mais comuns. Quatro isolados foram capazes de degradar cinco dos substratos utilizados. O isolado *B. subtilis* T28 se destacou na produção de amilase e protease e *B. subtilis* T45 de amilase e pectinase. Dentre 18 isolados testados 12 possuíam a capacidade de utilizar pelo menos dois carboidratos e 16 isolados ambos os sais orgânicos. Os resultados desse estudo mostraram que alguns dos isolados bacterianos provenientes deste ambiente pouco estudado possuem um potencial a ser explorado para produção de enzimas extracelulares como amilases, proteases e pectinases.

Palavras-chave: Identificação molecular. Enzimas extracelulares. *Bacillus*.

ABSTRACT

Microorganisms from extreme environments, such as the caatinga, are adapted to the low water availability and high temperatures and can be a good source of enzymes with useful characteristics for biotechnological and industrial uses. Taking this into account, the objective of this work was to evaluate the diversity, production of extracellular enzymes and some of the physiological characteristics of bacteria isolated from caatinga soil from the São João do Cariri region, Paraíba. The identification and phylogenetic analysis of the isolates were based on molecular methods, such as genomic DNA extraction, amplification and sequencing of the 16S rDNA gene, and analysis of the sequences using bioinformatics tools. Bacterial growth was assessed in the 25°C - 70 °C temperature range. The analysis of the production of extracellular enzymes was conducted using the specific substrates carboxymethylcellulose, citrus pectin, starch, gelatin, residual vegetal oil and chitin for the detection of cellulase, pectinase, amylase, protease, lipase and chitinase enzymes, respectively. The bacterial isolates' ability to use sugars (cellobiose, fructose, galactose, lactose, mannose, raffinose, xylose and salicin) and organic salts (sodium succinate and sodium citrate) as carbon sources were determined. It was found that the 28 tested isolates belonged to the *Bacillus* genus of the *Firmicutes* phylum, with 25 isolates showing similarity to the species *B. subtilis* and three to *B. tequilensis*. Regarding the growth temperature range, 25 of the isolates were classified as thermotolerant and three as thermophilic. All of the isolates produced at least two types of extracellular enzymes, with cellulases, proteases and lipases being the most common ones. Four isolates were capable of degrading five of the used substrates. The *B. subtilis* T28 isolate stood out on the production of amylase and protease and *B. subtilis* T45 of amylase and pectinase. Out of the 18 tested isolates, 12 had the ability to use at least two carbohydrates and 16 isolates were able to use both organic salts. The results of this study showed that some of the bacterial isolates from this understudied environment have the potential to be explored for the production of extracellular enzymes such as amylases, proteases and pectinases.

Keywords: Molecular identification. Extracellular enzymes. *Bacillus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de celulose.....	25
Figura 2 – Hidrólise da celulose por diferentes tipos de celulasas.....	26
Figura 3 – Estrutura do amido, amilose e amilopectina.....	28
Figura 4 – Ação de pectinases.....	30
Figura 5 – Ação de proteases.....	31
Figura 6 – Ação de lipases.....	33
Figura 7 – Ação de quitinases.....	36
Figura 8 – Método de purificação de isolados pelo método de esgotamento.....	41
Figura 9 – Eletroforese de amostras do DNAr 16S dos isolados de bactérias em gel de agarose.....	43
Figura 10 – Isolados T23 e T14 inoculados em placa de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente utilizando a técnica de esgotamento.....	50
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA genômico extraído dos isolados bacterianos do solo de caatinga.....	53
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose do gene DNAr 16S amplificado por PCR e purificado dos isolados bacterianos do solo de caatinga.....	55
Figura 13 – Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i> isoladas do solo da caatinga e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequencias de RNAr 16S utilizando análise <i>neighbour-joining</i> e o modelo Jukes-Cantor (JC). Os valores de <i>bootstrap</i> mostradas na árvore foram obtidos com base em 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequencias do GenBank são mostradas em parênteses.....	59
Figura 14 – Número de isolados positivos e negativos nos testes de produção de enzimas extracelulares.....	66

Figura 15 – Isolados de bactérias lipolíticas (<i>Bacillus subtilis</i> T3, T9, T12, T21, T33 e T37) em meio de cultura com óleo vegetal residual e Rodamina B. As colônias positivas exibem a fluorescência sob irradiação da luz UV.....	67
Figura 16 – Isolados de bactérias celulolíticas (T11, T12 e T48) em meio de cultura com carboximetilcelulose (CMC).....	69
Figura 17 – Isolados de bactérias pectinolíticas (T1, T13 e T48) em meio de cultura com pectina cítrica.....	70
Figura 18 – Isolados de bactérias amilolíticas (T28, T45 e T48) em meio de cultura com amido.....	72
Figura 19 – Isolados de bactérias proteolíticas (T28, T29, T33, T44 e T48) em meio de cultura com gelatina.....	73
Figura 20 – Número de isolados positivos e negativos em teste de uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade e pureza do DNA genômico extraído dos isolados de bactérias do solo de caatinga.....	52
Tabela 2 – Quantidade e pureza de DNAr 16S amplificado dos isolados de bactérias do solo de caatinga.....	54
Tabela 3 – Identificação dos isolados de bactérias do solo de caatinga baseada nas sequências parciais de DNAr 16S e nos resultados do BLAST.....	57
Tabela 4 – Faixa de temperatura de crescimento dos isolados de bactérias do solo de caatinga.....	62
Tabela 5 – Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de bactérias do solo da caatinga.....	65
Tabela 6 – Capacidade de uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono por bactérias do solo da caatinga.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTn: *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

CMC: Carboximetilcelulose

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAr 16S: Ácido desoxirribonucleico ribossomal da subunidade 16S

h: horas

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

min: minutos

NB: caldo nutriente

NB/10: caldo nutriente diluído 10 vezes

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

pb: pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

TBE: Tris-Borato-EDTA

UFC: Unidades formadoras de colônia

UV: Ultravioleta

YPS: Extrato de Levedura-Peptona-Extrato de Solo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Caatinga – o ecossistema do semiárido brasileiro.....	19
2.2. Enzimas extracelulares produzidas por bactérias.....	21
2.2.1. Celulases.....	24
2.2.2. Amilases.....	26
2.2.3. Pectinases.....	28
2.2.4. Proteases.....	30
2.2.5. Lipases.....	32
2.2.6. Quitinases.....	35
2.3. Gênero <i>Bacillus</i> – diversidade e características fisiológicas.....	36
3. OBJETIVOS	39
3.1. OBJETIVO GERAL	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Isolados de bactérias.....	40
4.2. Cultivo e purificação de bactérias.....	40
4.2.1. Extração e purificação do DNA genômico de isolados de bactérias.....	41
4.2.2. Amplificação do gene DNAr 16S dos isolados de bactérias.....	42
4.2.3. Sequenciamento do gene DNAr 16S dos isolados de bactérias.....	43
4.2.4. Análise de crescimento de isolados bacterianos em diferentes temperaturas.....	44
4.2.5. Análise da atividade enzimática dos isolados de bactérias do solo da caatinga.....	45
4.2.5.1. Atividade celulolítica.....	46
4.2.5.2. Atividade amilolítica.....	46

4.2.5.3. Atividade pectinolítica.....	46
4.2.5.4. Atividade proteolítica.....	47
4.2.5.5. Atividade lipolítica.....	47
4.2.5.6. Atividade quitinolítica.....	48
4.2.6. Avaliação da capacidade de uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1. Identificação e análise filogenética de isolados de bactérias.....	50
5.2. Faixa de crescimento de isolados de bactérias do solo de caatinga.....	61
5.3. Produção de enzimas extracelulares por bactérias do solo da caatinga.....	64
5.4. Uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono por bactérias isoladas do solo da caatinga.....	74
6. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A microbiota edáfica desempenha funções vitais para o equilíbrio e a dinâmica do sistema em que habita, o que inclui processos tais como os de decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes no solo, o que acaba sendo benéfico tanto para a flora quanto para a fauna que habita nestes solos. Estes processos se dão majoritariamente devido a capacidade destas bactérias de produzir os mais diversos tipos de enzimas extracelulares com função de degradação de compostos e macromoléculas.

A camada mais superficial do solo, por excelência, acaba sendo a camada que vai servir como via de entrada de matéria orgânica e, como consequência, tende a ser caracterizada por uma intensa atividade metabólica microbiana por apresentar uma maior quantidade de nutrientes, favorecendo o crescimento.

O semiárido brasileiro compreende sua extensão entre parte dos estados de Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, Bahia e norte de Minas Gerais, sendo a sua principal característica as precipitações pluviométricas extremamente irregulares e as altas taxas de evapotranspiração potencial anual, o que ocasiona em uma cobertura vegetal típica dessa região, com plantas em sua maioria de pequeno porte e com pelo menos alguma adaptação ao clima intensamente seco, algo que se reflete também em outros organismos deste ambiente, inclusive a microflora local.

Por esta ser considerada uma região onde predominam fatores abióticos tais como as altas temperaturas, a alta salinidade, a elevada incidência de radiação solar e o estresse hídrico prolongado, os micro-organismos destes tipos de sistemas ambientais representam um alto potencial para aplicações biotecnológicas e de bioprospecção de substâncias.

Acredita-se que a exposição de organismos a ambientes que são extremos (seja à condições extremas de temperatura, de pH, de déficit de matéria orgânica ou de nutrientes, de déficit hídrico ou à condições de alta salinidade), ao longo de diversas gerações, possa favorecer a uma seleção positiva para a produção de enzimas com atividades e funções diferentes daquelas encontradas em organismos que são

mesófilos e que portanto não estão tão bem adaptadas a funcionarem otimamente em tais ambientes extremos. Tal aspecto faz com que os organismos que consigam sobreviver a estas condições ambientais extremas sejam uma fonte promissora para a bioprospecção das mais diversas enzimas de natureza extracelular, caracterizando o potencial biotecnológico destes microrganismos, uma vez que as enzimas produzidas por microrganismos provenientes de ambientes extremos no geral toleram mais os fatores ambientais em que estão inseridas.

A microbiota do solo é fortemente influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, o que inclui fatores tais como a disponibilidade de nutrientes, a disponibilidade de matéria orgânica, de umidade do solo, a temperatura local, além de outros fatores físico-químicos. Sob climas áridos tais fatores no geral são desfavoráveis para o crescimento e sobrevivência bacterianos, sendo o estresse hídrico o maior fator que influencia esta diversidade populacional, além da disponibilidade limitada de nutrientes.

Poucos estudos passados procuraram investigar os microrganismos existentes no solo do bioma da caatinga, sendo um deles tendo sido desenvolvido por Goriach-Lira e Coutinho (2007), que estudaram a dinâmica populacional de bactérias presentes na rizosfera da gramínea *Aristida adscensionis* (Poaceae), onde foi possível se observar uma prevalência de bactérias mesofílicas, heterotróficas, formadoras de esporos e actinobactérias, sugerindo portanto o desenvolvimento de adaptações especiais às condições ambientais pelos microrganismos, da mesma forma que estes tipos de adaptações são observados tanto em plantas quanto em animais naturais deste ambiente (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Sendo assim, existem no geral poucas informações sobre os microrganismos da caatinga, e especialmente poucos estudos que dizem respeito tanto à diversidade quanto da prospecção de enzimas extracelulares por estas bactérias edáficas de natureza termofílica e/ou termotolerante.

As enzimas extracelulares produzidas por bactérias termotolerantes e termofílicas, especialmente àquelas que provêm de ambientes como a caatinga, onde não somente a resistência às temperaturas extremas é algo essencial, mas também a resistência ao processo de dessecação, à alta incidência de raios UV e a adaptabilidade ao solo oligotrófico se tornam importantes para a prospecção biotecnológica. As enzimas provenientes de bactérias termofílicas possuem adaptações na sua conformação e

composição que proporcionam maior resistência à temperaturas altas, impedindo que elas desnaturem facilmente nestas condições e assim percam a sua atividade. Isto se torna mais evidente ainda uma vez que a maioria dos processos industriais e biotecnológicos (além de boa parte dos usos domésticos em que se pode utilizar este tipo de enzimas) se dá sob condições de temperaturas ou de pH extremos e fazer o uso de uma enzima que naturalmente consiga se manter funcional nestas condições tornaria o processo mais barato e mais rápido.

Devido à vasta extensão em área (correspondente a 54% da área da região Nordeste e a 11% da área do território brasileiro) e a imensa riqueza biológica do semiárido brasileiro, associado a poucos estudos relativos a diversidade da comunidade bacteriana desse ecossistema e seu potencial para bioprospecção de enzimas, trabalhos deste tipo, que verificam a riqueza de bactérias que são, por natureza, termofílicas ou termotolerantes, são de grande importância para a área, bem como a avaliação de seu potencial de produção enzimática e caracterização fisiológica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Caatinga – o ecossistema do semiárido brasileiro

A caatinga se trata do único Domínio fitogeográfico que é inteiramente brasileiro e sua vegetação é, em sua essência, heterogênea no que diz respeito à sua fitofisionomia e estrutura. Deste modo considera-se que existem duas fitofisionomias para este bioma, sendo elas a caatinga arbórea e a caatinga arbustiva (FERNANDES, 2000; ANDRADE et al., 2005), embora no geral a caatinga seja considerada uma espécie de savana-estepe (IBGE, 1992), caracterizada pela presença de florestas secas e vegetação arbustiva decíduas, cujas folhas são perdidas durante a estação seca, presença de cactáceas, de pedregulhos, de vegetação típica local raquítica e rala com grandes clareiras e afloramentos de rochas, onde o solo permanece descoberto durante quase todo o ano devido à ausência de serrapilheira na época de seca pela queda de folhas durante o período de estiagem (ANDRADE et al., 2005; TABARELLI et al., 2018).

A caatinga é dividida em 10 ecorregiões e 135 unidades geoambientais e é geralmente caracterizada por possuir extensas superfícies planas com altitudes que variam entre 300 e 500 m e planaltos que podem atingir os 1000 m de altura, onde a vegetação é distinta, composta por florestas úmidas, cerrados e campos rupestres, as temperaturas médias são mais baixas e a precipitação é de 1800 mm/ano. (TABARELLI et al., 2018).

Tal fisionomia de uma vegetação sem folhas e com troncos e galhos de cor branco-acinzentada é o que dá a característica de “mata branca” à caatinga durante a época de seca, a qual dá origem ao nome deste bioma na língua tupi-guarani formado por duas palavras: “KAA” significando “floresta” ou “mata” e “TINGA” significando “branco” ou ainda “claro” (ALVES, 2007; TABARELLI et al., 2018).

Caatinga abrange até pouco mais de cerca de 912 mil quilômetros quadrados, é uma das seis grandes regiões ecológicas brasileiras, tem seu centro no nordeste do país, localizando-se entre os paralelos de 2°54’S até 17°21’S, constituindo o que é conhecido como o Polígono das Secas (ALVES, 2007; TABARELLI et al., 2018). Nestas regiões semiáridas, tem crescido cada vez mais os índices de alteração da vegetação nativa e de degradação dos recursos naturais, o que por sua vez acaba

elevando os riscos do processo de desertificação como uma consequência de uma má gestão humana de terras cultivadas e de pastagem (DREGNE, 1986; ANDRADE et al., 2005; TABARELLI et al., 2018).

As alterações na caatinga tiveram início com o processo de colonização do Brasil e, de forma geral, a ocupação do espaço agrícola do semiárido brasileiro tem o histórico de ter sido feito sem o planejamento do uso dos recursos naturais disponíveis na área e sem a criação de medidas de políticas públicas para desenvolvimento sustentável (SOUZA et al., 2008; TABARELLI et al., 2018).

Isto piora a situação em áreas que são mais vulneráveis à desertificação, onde os processos de pecuária extensiva, plantio em encostas de serras, queimadas, extração madeireira para carvão, caça, indústrias de cerâmica e mineração, associado aos regimes de baixa pluviosidade e à alta presença de erosão do solo causada pelo vento e água, comprometem negativamente a sustentabilidade da área a longo prazo, causam a compactação do solo e levam a um processo de perda contínua da vegetação nativa (ANDRADE et al., 2005; SOUZA et al., 2008; TABARELLI et al., 2018).

Os solos vêm sendo explorados de forma irracional para a criação de bovinos, caprinos e ovinos, o que tem conduzido as áreas a um processo elevado de desertificação. Associado a isso, ocorre também o processo de salinização dos solos, resultante da alta taxa evaporativa. Os sais ascendem às camadas superficiais, diminuem a permeabilidade, destroem a estrutura e eliminam a matéria orgânica e microfauna, facilitando o transporte de terras férteis pelas chuvas. Com isto, estas áreas apresentam poucos elementos arbustivos e muita pedregosidade superficial, especialmente onde o relevo é mais suave e ondulado (SOUZA et al., 2008; TABARELLI et al., 2018).

Durante o período chuvoso, as erosões aumentam e destroem ainda mais o solo, levando à indisponibilidade de nutrientes para a vegetação. Os solos do semiárido são no geral rasos e pedregosos e, quando não há uma cobertura vegetal, isto dificulta o armazenamento de águas das chuvas. Para os solos que são mais profundos, estes atualmente também se encontram mais expostos (SOUZA et al., 2008).

A microrregião do Cariri Oriental da mesorregião da Borborema Central, Paraíba, onde é localizado o município de São João do Cariri, é considerada uma das regiões mais secas do país. O clima da região, de acordo com a classificação climática de Koppen, é do tipo semiárido quente (BSh), com distribuição irregular das chuvas em curtos períodos e estação seca prolongada onde a temperatura média mensal do mês mais frio é superior a 18 °C, a estação chuvosa ocorre de fevereiro a abril, e a precipitação pluvial média anual é inferior a 600 mm (ALVES et al., 2014). No município de São João do Cariri as temperaturas médias anuais são em torno de 24,5 °C e uma média pluviométrica de 379,2 mm/ano (SOUZA et al., 2008).

Os solos da área de São João do Cariri vêm sofrendo um longo processo de degradação devido ao uso inadequado dos recursos naturais da área, o que contribui para o aparecimento de áreas desertificadas, fomentando ainda mais a degradação do bioma caatinga.

São João do Cariri foi apontado como um dos municípios mais comprometidos pelo processo de desertificação dentro do estado da Paraíba, com estágios de degradação que variam entre moderado e severo em 84% do território. Os baixos índices pluviométricos juntamente com o uso das áreas como pastagem dificultam o processo de regeneração e desenvolvimento da vegetação da caatinga e esta degradação leva, a impactos sociais, econômicos e ambientais. (SOUZA et al., 2008).

A vegetação predominante da área é do tipo caatinga hiperxerófila, esta vegetação da caatinga é heterogênea com relação à sua fitofisionomia e estrutura, tornando difícil elaboração de classificações capazes de contemplar as inúmeras tipologias. A fitofisionomia geral corresponde à caatinga arbórea e as espécies mais encontradas são *Mimosa tenuiflora*, *M. stipulacea*, *Croton sonderianus*, *Aspidosperma pyrifolium*, *Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Jatropha molissima*, *Cnidoscolus phyllacanthus* e *Capparis flexuosa* (ANDRADE et al., 2005; SOUZA et al., 2008).

2.2. Enzimas extracelulares produzidas por bactérias

As enzimas são moléculas, muitas vezes de natureza proteica, que catalisam as reações químicas que não ocorreriam sem elas ou ocorreriam de forma muito mais

lenta. A catalise da reação se dá devido à capacidade da enzima de propiciar uma acomodação mais confortável ao estado de transição de um substrato. Cada enzima catalisa apenas um único tipo de substrato específico e é esta capacidade catalítica altamente específica das enzimas que as tornam adequadas para aplicações industriais (ALBERTS, 2017; NELSON; COX, 2020).

As enzimas produzidas por microrganismos do solo são uma fração muito importante da matéria orgânica deste ambiente, participando da catálise de diversas reações necessárias para a vida de microrganismos edáficos, para a ciclagem de nutrientes, para a formação da matéria orgânica e da estrutura do próprio solo (DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011).

Com relação ao uso destas enzimas no setor biotecnológico, diversos dos processos tecnológicos atualmente fazem uso de catalisadores biológicos ao invés de catalisadores químicos para as reações de conversão química. Esses catalisadores são os responsáveis por diminuir a energia de ativação (ΔG) necessária para que ocorra uma reação e como consequência elevam a velocidade da mesma, além de terem a vantagem de que os catalisadores biológicos requerem condições mais brandas para funcionarem (ao contrário das condições mais extremas que se tem no uso de catalisadores puramente químicos), são compatíveis com substratos que tem uma origem sintética, catalisam reações tanto de síntese quanto de degradação e apresentam uma elevada seletividade com certos tipos de reação e substratos (WARNER; CANNON; DYE, 2004; MESSIAS et al., 2011).

Do solo da catinga já foram isolados vários micro-organismos (bactérias e fungos) com potencial biotecnológico em laboratório, à exemplo dos trabalhos de Gorlach-Lira e Coutinho (2007), Soares Jr. et al. (2012), Lima et al. (2014) e Martins et al. (2015).

O uso destas enzimas em indústrias garante a possibilidade de se criar processos tecnológicos que são tão eficientes quanto os processos que ocorrem na própria natureza, além de terem o aditivo de que causam menos ou até mesmo nenhum tipo de risco ambiental com relação aos dejetos ou efluentes derivados do seu uso, podendo inclusive estas enzimas serem utilizadas para fins tais como a biodegradação de compostos tóxicos, o tratamento de efluentes e a biorremediação ambiental (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MESSIAS et al., 2011).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular definiu critérios para denominação e classificação de enzimas, onde à cada enzima é atribuído um número de EC (Enzyme Commission), que contém quatro números separados por pontos (W.X.Y.Z). Os números W, X e Y referem-se à classe, subclasse e sub-sub-classe das enzimas, respectivamente, e o número Z é o que é específico de cada tipo diferente de enzima. No geral uma enzima pode ter vários nomes diferentes e na sua nomenclatura também há certa ambiguidade, sendo assim, atribuir um número específico à cada tipo de enzima se trata de uma tentativa de resolver tal ambiguidade. Sendo assim, foram definidas 6 classes diferentes de enzimas: oxi-redutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5) e ligases/sintetases (classe 6). Esta classificação proposta é organizada a partir do tipo funcional da enzima, de forma que diferentes proteínas, mesmo que com estruturas diferentes, porém com uma mesma atividade catalítica (isozimas), possuem o mesmo nome e o mesmo número de EC. Nas reações catalisadas pelas hidrolases (EC 3.X.Y.Z), os reagentes são a água e o substrato, que se rompe em suas partes constituintes, a catálise ocorre nas reações de clivagem pela adição de uma molécula de água à ligações covalentes tais como as ligações do tipo C-C, C-O, C-N e O-P e, no geral, quando um composto tem o sufixo “ase”, a enzima se trata de uma hidrolase (amilase, lipase, celulase, pectinase, quitinase, protease, etc) e elas quase sempre catalisam reações fisiologicamente irreversíveis.

Mais de 4.000 enzimas são conhecidas atualmente, mas aproximadamente apenas 5% deste total são usadas comercialmente, geralmente de origem microbiana, sendo que as enzimas produzidas por fungos são as mais importantes na indústria. Deste total, 75% destas enzimas pertencem ao grupo das hidrolases, que são consideradas as enzimas com maior importância industrial atualmente, sendo que, destas enzimas, 90% são produzidas por microrganismos (JAEGER et al., 1997; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; MESSIAS et al., 2011; BANERJEE; RAY, 2017; LIU; KOKARE, 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). As enzimas provenientes de microrganismos selecionados a partir do solo têm ainda a vantagem de que são considerados seguros para o uso humano, uma vez que tais bactérias no geral não são particularmente patogênicas para a nossa espécie (MARTINS et al., 2015).

A produção de enzimas pelos microrganismos pode ser influenciada negativamente ou positivamente por diversos fatores, especialmente com relação às

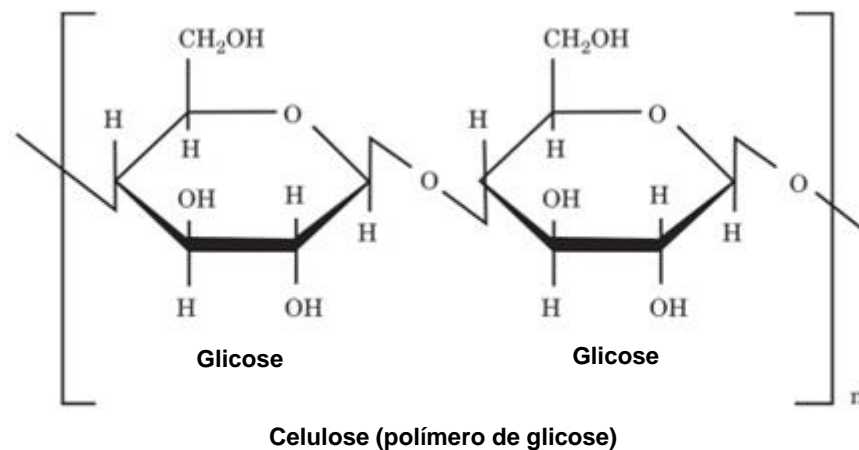
condições de cultivo do meio de cultura, tais como: o tipo e a concentração da fonte de carbono escolhida, a aeração, a agitação, o pH e a temperatura do meio (KUMAR; TAKAGI, 1999). Porém, mesmo assim, a prospecção de enzimas provenientes de microrganismos ainda são as que tem um maior custo-benefício pois os microrganismos possuem as vantagens de não necessitarem de amplos espaços para o seu crescimento; conseguem degradar (e crescer) em vários tipos diferentes de substratos, inclusive até mesmo em resíduos industriais; os seus fatores de crescimento que muitas vezes podem ser limitantes para eles como a concentração de nutrientes, temperatura, pH, concentração de oxigênio e concentração de células podem ser facilmente manipulados e, por fim, estes organismos podem ser facilmente modificados geneticamente para obtenção de mutantes mais apropriados ou até mesmo para produzirem enzimas típicas de eucariotos (BRAVO et al., 2000; LOWE, 2001).

Com isto, a demanda pelo uso destas enzimas tem crescido cada vez mais a cada ano, sendo que a maioria do seu comércio é feito pelos países da União Europeia, pelos Estados Unidos e pelo Japão. O mercado mundial para enzimas industriais foi estimado em aproximadamente 4,2 bilhões de dólares e com uma previsão de crescimento anual de aproximadamente 7% durante o período de 2015 até 2020, chegando a um valor de quase 6,2 bilhões de dólares (SINGH et al., 2016).

2.2.1. Celulases

A celulose é a substância orgânica de maior abundância na biosfera e chega a compor até 50% da biomassa que é sintetizada pela fixação de CO₂ no processo de fotossíntese e, como isto a sobrevivência e o crescimento da maioria dos microrganismos depende da fonte de C e de energia proveniente da celulose. A celulose pode ser degradada pelas enzimas celulases em moléculas de glicose, celobiose e oligossacarídeos de alto peso molecular (WHITE, 1982).

As celulases catalisam a degradação da molécula de celulose, que se trata de um longo polímero (um polissacarídeo) composto por monômeros de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4 (Figura 1) (DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA; 2011).



Adaptado de Dahm, Szajdak e Golińska (2011).

Figura 1. Estrutura de celulose.

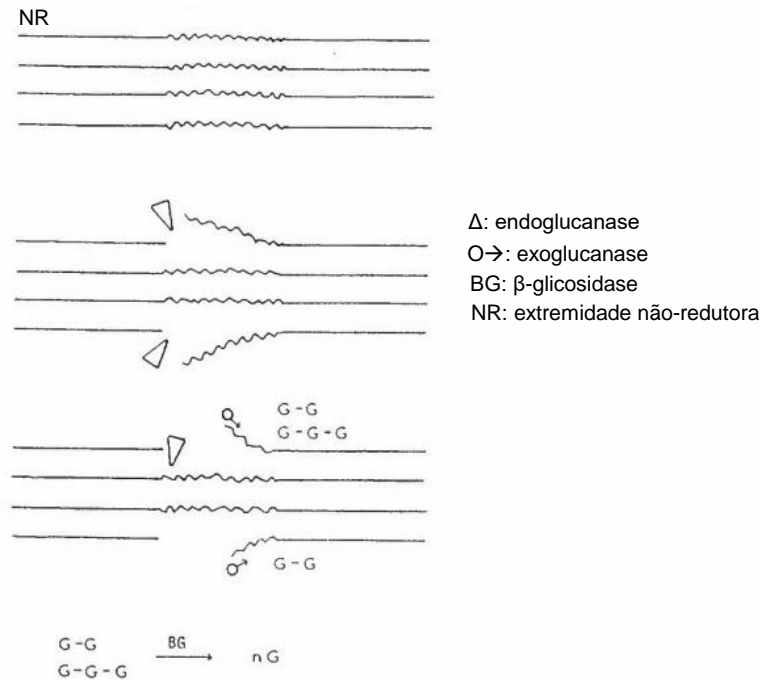
As celulasas podem ser divididas em três tipos diferentes, dependendo de onde esta enzima vai atuar na catálise da molécula de celulose:

a) endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4), que hidrolisa as ligações internas β -1,4-glicosídicas, preferencialmente nas regiões amorfas das microfibrilas de celulose, e leva à formação de novas extremidades não-redutoras da cadeia de celulose;

b) exo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.74), que atua justamente nas extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia de celulose, esta ação enzimática hidrolisa a cadeia de celulose em unidades de celobiose (oligossacarídeo formado por duas unidades de glicose), removendo então a glicose ou a celobiose da cadeia de celulose;

c) β -D-glicosidase (EC 3.2.1.91), que hidrolisa a ligação β -1,4 da unidade de celobiose, liberando no processo duas moléculas de glicose (Figura 2) (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008; DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011).

Como as celulasas são enzimas muito importantes para a ciclagem da celulose global, é necessário entender o papel destas enzimas em ambientes de solo, uma vez que a celulose raramente está presente em sua forma pura na natureza, estando na verdade quase sempre presente no meio de uma matriz composta por hemicelulose, lignina e outros polímeros, que podem chegar a compor uma boa parte do peso seco vegetal (LYND et al., 2002; DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011).



Adaptado de Chambost (1986).

Figura 2. Hidrólise da celulose por diferentes tipos de celulases.

As celulases ideais para o uso industrial devem possuir características necessárias para o seu uso nas condições presentes em biorefinarias. Com isso, no geral as enzimas provenientes de certos tipos de ambientes são consistentes com as condições do mesmo, a exemplo de celulases de ambientes ácidos e quentes tendo a sua atividade ótima sob estas condições ou celulases de ambientes alcalinos tendo a sua atividade ótima em valores de pH mais altos (FENG et al., 2007; JIANG et al., 2009; DUAN; FENG, 2010;).

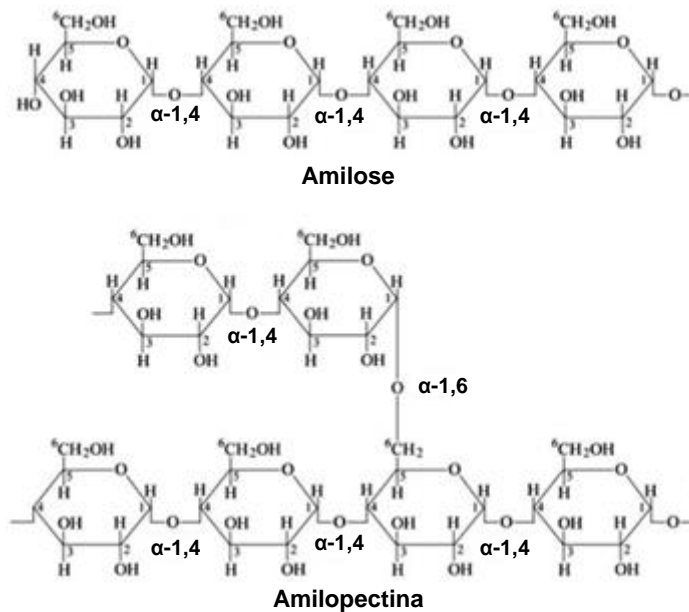
Apenas ocasionalmente as propriedades das enzimas podem ser diferentes daquele ambiente do qual são provenientes, como no caso de celulases com atividade ótima em temperaturas baixas mas que são provenientes de ambientes quentes (PANG et al., 2009; DUAN; FENG, 2010) ou celulases halotolerantes isoladas de um solo que é não-salino (VOGET; STEELE; STREIT, 2006; DUAN, FENG, 2010).

2.2.2. Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido, e podem ser divididas em α -amilases (EC 3.2.1.1), β -amilases (EC 3.2.1.2) e γ -amilases (EC 3.2.1.3). As α -amilases são endoamilases que atuam na clivagem da ligação α -1,4 de forma aleatória e levam à liberação de oligossacarídeos lineares e ramificados. As β -amilases são exoamilases que clivam o amido nas extremidades não-redutoras e hidrolisam as ligações α -1,4, liberando assim resíduos de maltose (oligossacarídeo formado por 2 unidades de glicose). As γ -amilases ou glicoamilase são exoamilases que clivam o substrato nas regiões não-redutoras e nas ligações do tipo α -1,4 e α -1,6, liberando os monossacarídeos de glicose como produto final (GUPTA et al., 2003; ABD-ELHALEM et al., 2015).

O amido, logo depois da celulose, é o polissacarídeo mais abundante do planeta, pois ele é a substância de reserva energética da maioria das células vegetais, podendo ser armazenado em grânulos especiais nas células em estruturas de armazenamento das plantas, à exemplo de tubérculos, frutas e sementes. Os grânulos de amido são compostos por moléculas de amilose e de amilopectina. A amilose é uma cadeia longa e linear de monômeros de glicose unidos por ligações do tipo α -1,4 que compõe cerca de 25% do amido, enquanto que a amilopectina é uma estrutura de tamanho menor formado por uma cadeia linear de monômeros de glicose unidos por ligações do tipo α -1,4 e que estão ligadas a cadeias laterais lineares de glicose unidas por ligações do tipo α -1,6 (Figura 3), chegando a compor a maior parte do amido (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018).

Devido à importância nutritiva do amido para todos os seres vivos, as amilases são produzidas por diversos tipos de organismos (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016) e seu uso comercial representa até 15-25% do mercado mundial de hidrolases (MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). As amilases podem ser utilizadas nas mais diversas indústrias tais como as indústrias de papel, do setor alimentício e de bebidas até mesmo às indústrias têxteis, farmacêutica, de tintas e de detergentes de roupas (ABD-ELHALEM et al., 2015).



Adaptado de Ghanbarzadeh e Almasi (2013).

Figura 3. Estrutura do amido, amilose e amilopectina.

2.2.3. Pectinases

As pectinases (ou enzimas pectinolíticas), são enzimas responsáveis por hidrolisar as substâncias pécicas, que são polissacarídeos que são bastante abundantes na parede celular primária de plantas, especialmente na lamela média sob a forma de pectato de cálcio ou de magnésio (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Estas enzimas são bem distribuídas entre microrganismos como fungos e bactérias, bem como em plantas, provavelmente devido à abundância das substâncias pécicas na natureza.

Estas substâncias pécicas formam uma matriz na qual a celulose das paredes celulares das plantas se insere, elas possuem um alto peso molecular e formam macromoléculas glicosídicas complexas, além de terem como características o fato de serem moléculas ácidas e carregadas negativamente. Os polissacarídeos pécicos são ricos em ácido galacturônico e são compostos principalmente por galacturonanos e ramnogalacturonanos em que o carbono 6 do galactato é oxidado em um grupo carboxila. Estes grupos carboxila do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metila e parcialmente neutralizados por alguns tipos de ions, alguns destes grupos podem ainda ser acetilados (WHITAKER, 1990; DAHM;

SZAJDAK; GOLIŃSKA; 2011). Estas substâncias pécticas podem ser classificadas em 4 tipos distintos (DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011):

a) Protopectina: são substâncias pécticas insolúveis em água presentes em tecidos vegetais intactos;

b) Ácido péctico: é um polímero de galacturanos solúvel em água que contém quantidades negligenciáveis de grupos metoxilo. Os sais deste tipo de ácido são chamados de pectatos;

c) Ácidos pectínicos: são cadeias de poligalacturonanos que contém até 75% de unidades metiladas. O ácido pectínico ou o sal derivado desse ácido são chamados de pectinases;

d) Pectina (galacturonato polimetil): é a substância polimérica na qual mais de 75% dos grupos carboxila do galacturonato estão esterificados com metanol.

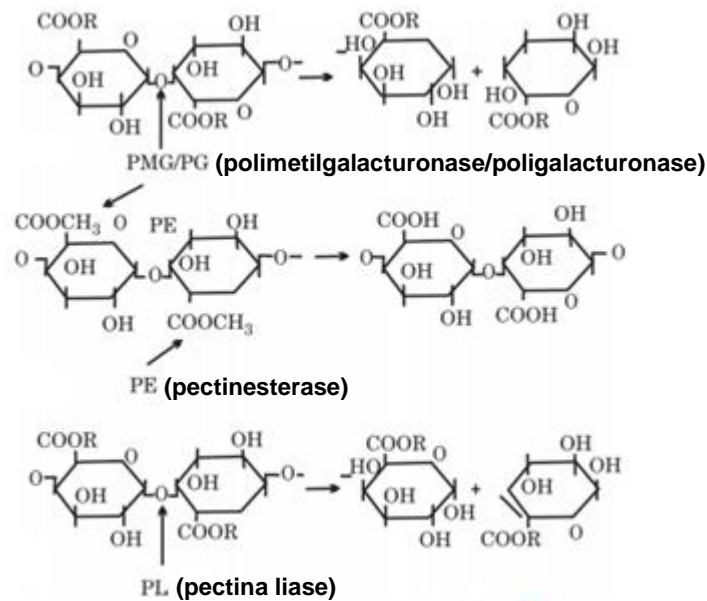
Como pode-se ver, as substâncias pécticas podem estar presentes nas mais diversas formas em células vegetais e isto também é a razão para a existência de várias enzimas pectinolíticas, que podem ser divididas em três tipos distintos:

a) Protopectinases: degradam a protopectina insolúvel e liberam com isto uma pectina solúvel e altamente polimerizada;

b) Esterases: catalisam a de-esterificação da pectina a partir da remoção dos ésteres metoxilo;

c) Despolimerases: As despolimerases catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das porções de ácido D-galacturônico das substâncias pécticas via hidrólise (no caso das pectinases) ou via β -eliminação (no caso das liases). (TARAGANO; SANCHEZ; PILOSO, 1997; CAMARGO, 2005; DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011).

As poligalacturonases (ou PGases) são enzimas pectinolíticas que catalisam a clivagem hidrolítica da cadeia de ácido galacturônico com a introdução de água através da ponte de oxigênio. As pectina-liases (ou transeliminases) fazem a quebra não hidrolítica dos pectatos ou pectinatos através da quebra transeliminativa do polímero péctico. Elas podem ser classificadas com base no seu tipo de ação e do substrato no qual agem em: poligalacturonato liase (pectato liase ou PGL) e em polimetilgalacturonato liase (pectina liase ou PL) (Figura 4).



Adaptado de Jayani, Saxena e Gupta (2005).

Figura 4. Ação de pectinases.

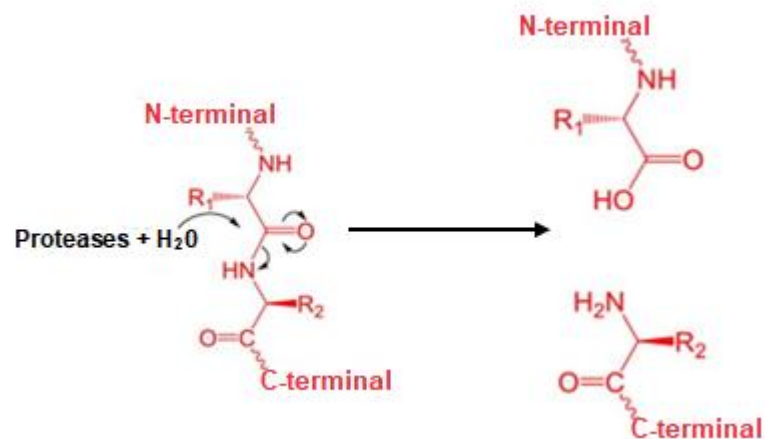
A ação combinada das pectinesterases e poligalacturonases quebram a molécula de pectina, enquanto a pectina liase é capaz de degradar a molécula de pectina altamente ramificada, sem o auxílio prévio de outra enzima (TARAGANO; SANCHEZ; PILOSOFF, 1997; CAMARGO, 2005; DAHM; SZAJDAK; GOLIŃSKA, 2011).

As pectinases são utilizadas em indústrias em processos que envolvem a degradação de materiais provenientes de plantas (geralmente de frutas naturalmente ricas em pectina como maçãs ou frutas cítricas) tais como na aceleração do processo de extração de sucos de fruta ou ainda em processos tais como a produção de vinho e a clarificação de sucos de frutas ou do próprio vinho. Assim como ocorre em todas as enzimas, as pectinases possuem uma temperatura e pH ótimos nos quais elas atuam, então por exemplo, o ideal para uma pectinase de uso comercial é que ela possa permanecer ativa em temperaturas altas e valores de pH ácido.

2.2.4. Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas pela quebra de suas ligações peptídicas (Figura 5). Elas podem ser classificadas de acordo com o

seu mecanismo de ação em endo- ou exopeptidases. As endopeptidases (EC 3.4.21 – 3.4.24, 3.4.99) clivam as ligações peptídicas de aminoácidos localizados no interior das cadeias de polímeros de peptídeos, enquanto as exopeptidases (EC 3.4.11 – 3.4.19) atuam nas regiões amino-terminal e carboxil-terminal de aminoácidos localizados nas extremidades destas cadeias. Estas enzimas podem também ser divididas de acordo com o pH em que atuam melhor (proteases ácidas, neutras e alcalinas) e podem ainda ser agrupadas em seis famílias diferentes, que são as proteases de serina, de treonina, de cisteína, de ácido aspártico, de ácido glutâmico e as metaloproteases (MCDONALD, 1985; CONTESINI; MELO; SATO, 2017; SHARMA et al., 2017; AGUILAR; SATO, 2018; CHEW; TOH; ISMAIL, 2019; GURUMALLESH et al., 2019).



Adaptado de Shafee (2013).

Figura 5. Ação de proteases.

As proteases do solo possuem um papel significativo na mineralização do nitrogênio, regulando a quantidade de N disponível para as plantas, por exemplo. A atividade destas enzimas extracelulares é afetada tanto por fatores abióticos quanto por fatores bióticos. A baixa concentração de ácidos húmicos em solos neutralizados, por exemplo, pode inibir ou estimular algumas atividades de protease através dos grupos carboxila destes ácidos (DAHM, SZAJDAK, GOLIŃSKA, 2011). A atividade destas enzimas pode indicar não somente a capacidade biológica do solo para a

conversão enzimática do substrato, mas também tem papel fundamental na ecologia dos microrganismos do sistema (BURNS, 1982; DAHM, SZAJDAK, GOLIŃSKA, 2011).

As proteases desempenham um papel importante em aplicações industriais e estão entre os três mais importantes grupos de enzimas industriais, chegando a compor até 60% de toda a venda internacional destas enzimas (LIMA et al., 2008, MARTINS et al., 2015).

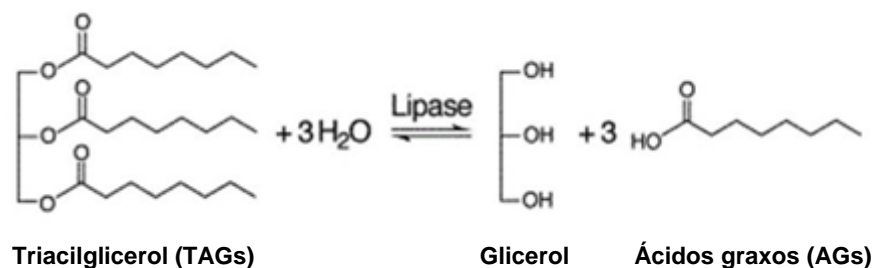
As proteases colagenolíticas, por exemplo, podem ser utilizadas na área da medicina e em aplicações terapêuticas. As proteases, além das várias aplicações na indústria farmacêutica, podem ser utilizadas no setor alimentício, na indústria de bebidas, de fotografia, elas têm um papel muito importante na indústria de detergentes para a remoção de manchas proteicas em roupas, facilitando o processo de lavagem sem danificar o tecido lavado no processo (esta indústria que requer mais de 30% da produção mundial de proteases microbianas (HORIKOSHI, 1996; UYAR; BAYSSAL, 2004), na indústria cosmética, na indústria de tratamento do couro e no setor agrícola para o biocontrole de nematoides, como biofertilizantes ou para a produção de biogás (RAO et al., 1998; LINTNER; PESCHARD, 2000; WATANABE, 2004; KANTH et al., 2008; LIMA et al., 2014b).

As proteases de *B. subtilis* inclusive já foram utilizadas com sucesso em processos de desproteinização de resíduos de crustáceos para a produção de quitina, em substituição ao uso de ácidos ou bases muito fortes, o que elimina o risco de descaracterização do substrato e como consequência ainda reduz a liberação de dejetos tóxicos derivados deste processo (YANG et al., 2000).

Como ocorre com todas as outras enzimas, as proteases de uso industrial geralmente continuam funcionando bem sob condições extremas de valores de pHs ácidos e/ou alcalinos e sob temperaturas altas, com variações a depender da espécie ou da cepa da bactéria produtora da enzima escolhida (LIMA et al., 2014b; MARTINS et al., 2015).

2.2.5. Lipases

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas pertencem ao grupo das hidrolases (carboxilesterases) que fazem a clivagem dos triacilgliceróis (TAGs) de cadeia longa (com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono) em um grupo glicerol e 3 grupos de ácidos graxos livres (Figura 6). As enzimas que tem a capacidade de hidrolisar os acilgliceróis com cadeias menores do que 10 carbonos são chamadas de esterases (VERGER, 1997; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; GHALY et al., 2010; MESSIAS et al., 2011) Elas possuem um potencial biotecnológico significativo como catalisadores de reações de síntese orgânica que ocorrem em meio não-aquoso, utilizando processos simplificados com altos rendimentos (MESSIAS et al., 2011).



Adaptado de Jaeger e Reetz (1998).

Figura 6. Ação de lipases.

Depois das carboidrases e das proteases, as lipases constituem um dos grupos de enzimas mais vendidos no mundo, sendo a maioria delas provenientes de microrganismos procariotos (embora uma menor porção seja proveniente de fungos, plantas ou de animais). As lipases provenientes de microrganismos podem ser utilizadas em indústrias como aditivos em alimentos (nas indústrias de pães, queijos e chás), para realçar ou modificar as propriedades dos mesmos, podem ser utilizadas em detergentes para atuar na hidrólise de manchas de gorduras, no tratamento de efluentes de origem oleosa, em processos de biorremediação ambiental, ou ainda em indústrias de cosméticos, farmacêuticas, têxteis, de polpa de papel, de processamento de couro, em biossensores, oleoquímicas, agroquímicas, ou ainda em reações de transesterificação para a conversão de óleos em biodiesel. O atual aumento no interesse nessas enzimas microbianas ocorre devido à sua facilidade de obtenção (quando comparado com as de origem animal), à sua considerável estabilidade, além

da sua diversidade, complexidade e do seu potencial biotecnológico (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MESSIAS et al., 2011; MARTINS et al., 2015).

Ocorre um aumento da atividade das lipases quando ocorre a separação da fase lipídica da fase aquosa, desta forma, a emulsão formada na interface água-óleo é o que causa uma mudança conformacional na estrutura quaternária desta enzima, em um processo também chamado de “ativação interfacial” (SAXENA et al., 2003; HASAN, SHAH, HAMEED, 2009; REIS et al., 2009). Os substratos das lipases são óleos e gorduras que contem TAGs formados por ácidos graxos de cadeia longa (ligações ésteres do tipo tríplexes), enquanto as esterases atuam em uma única ligação éster. Todas as lipases podem atuar sob os substratos das esterases, mas nunca o oposto (BROCKMAN, 1984; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; MESSIAS et al., 2011).

Em um contexto de funções destas lipases para os microrganismos em um ambiente natural, elas podem ter função de fosfolipases e, com isso, atuar como um tipo de mecanismo de defesa, pois quando são excretadas para o meio extracelular, acabam gerando uma competição com o resto da microflora local ou podem ainda facilitar a digestão de lipídeos e de ácidos graxos livres e com isso auxiliam no processo de adesão célula-célula e célula-hospedeiro para as bactérias (STEHR et al., 2003).

As lipases também podem realizar reações de síntese, a depender das condições presentes. Tais reações podem ser sob a forma de esterificação, aminólise, transesterificação, entre outros. No geral, as enzimas do tipo lipase não requerem cofatores, são bastante estáveis em temperaturas mais elevadas (um detalhe importante visto que muitos dos processos industriais atuais utilizam faixas extremas de temperatura e as lipases oriundas de bactérias termofílicas tem papel importante na indústria devido à elevada estabilidade em altas temperaturas), tem alta especificidade com os seus substratos e conseguem permanecer ativas em uma ampla faixa de pH e todos estes fatores contribuem para que tais enzimas possam ser facilmente e amplamente aplicadas na maioria dos processos industriais utilizados atualmente (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MESSIAS et al., 2011).

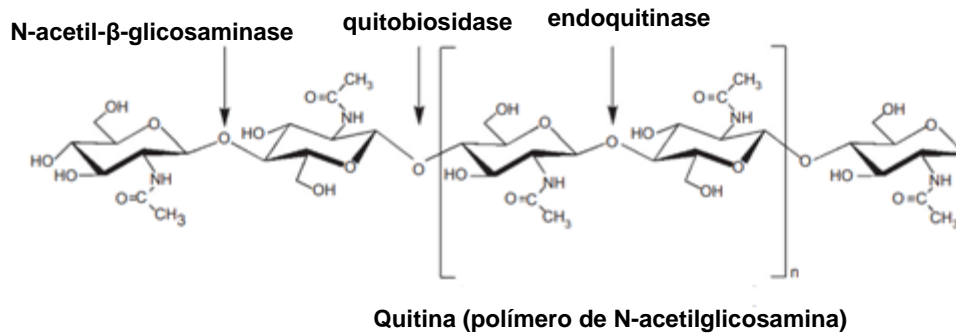
Na indústria de detergentes, por exemplo, as lipases facilitam o processo de limpeza de tecidos pois hidrolisam os lipídeos das sujeiras e favorecem a solubilização dos mesmos na água (PANDEY et al., 1999; MESSIAS et al., 2011), estas lipases devem por exemplo ser significativamente estáveis em pH alcalino e em altas temperaturas, além de não serem desnaturadas facilmente por surfactantes, uma vez que estas condições são as mais comumente presentes nos processos de lavagem, além de que as lipases de origem biológica possuem a vantagem de serem completamente biodegradáveis, o que reduz drasticamente os impactos ambientais destes tipos de processos (HASAN; SHAH; HAMEED; 2006; MESSIAS et al., 2011).

2.2.6. Quitinases

A quitina é, junto com a celulose e o amido, um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. Ela está presente no exoesqueleto e nos tecidos conectivos dos artrópodes e na parede celular dos fungos (KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2017).

As quitinases (E.C 3.2.1.14) são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do polímero linear da quitina que contem a ligação do tipo β -1,4 nos resíduos de N-acetilglucosamina (NAG) (WANG; YANG, 2007; MACDONALD, 2010). Elas podem ser divididas em endoquitinases, que hidrolisam aleatoriamente o polímero de quitina no meio da sua extensão e as exoquitinases, que podem ser as: a) quitobiosidases ou β -D-acetilglicosaminidases, que catalisam nas extremidades não redutoras da quitina e liberam diacetilquitobiose e as b) N-acetilglicosaminases, que removem os resíduos de NAG das extremidades não redutoras dos produtos gerados pelas endoquitinases e quitobiosidases (Figura 7) (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003; CHEN; SHEN; LIU, 2010; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2017).

Estas enzimas podem ser utilizadas com a função de antimicrobianos ou de inseticidas (ambas funções uteis para o controle de patógenos de plantas, uma vez que tanto os fungos quanto os insetos tem grandes quantidades de quitina em seus corpos), possuem utilizações na indústria alimentícia na preservação de alimentos e indústria farmacêutica como melhoradores de imunidades, carreadores de fármacos, antioxidantes ou controle de colesterol. (MATSUMOTO; GUEVARA-GONZALEZ, 2006; CHEN; SHEN; LIU, 2010; KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2017).



Adaptado de Karthik, Binod e Pandey (2017).

Figura 7. Ação de quitinases.

2.3. Gênero *Bacillus* – diversidade e características fisiológicas

O gênero *Bacillus* (Cohn 1872) é um gênero de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacilales*, família *Bacillaceae*, que engloba cerca de 70 espécies de bactérias, sendo algumas de bastante importância médica e científica, como é o caso de *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (THWAITE, ATKINS, 2012). Além disso, as bactérias deste gênero também ocupam um lugar de importância para a humanidade pois muitos de seus membros tem importância industrial na produção de enzimas, especialmente aquelas que possuem resistência a pH alcalino ou ácido e temperaturas altas e podem ser usados em processos industriais mais agressivos, além de que poucos de seus membros são patogênicos (SHARP; RILEY; WHITE, 1992).

Como alguns dos exemplos do uso industrial das enzimas produzidas por este gênero, temos *B. licheniformis* como produtores de proteases (SILVA, 2011) e *B. stearothermophilus* como sendo produtores de proteases do tipo colagenolíticas (LIMA et al., 2014b). Temos ainda *B. stearothermophilus* e *B. megaterium* como produtores de lipases resistentes a pH variado e alta temperatura (KAMBOUROVA et al., 2003; LIMA et al., 2004; SILVA; LIMA; PINOTTI, 2014). Além disto, existem trabalhos que demonstram *B. amyloliquefaciens* como produtores de amilases (ABDELHALEM et al., 2015). A espécie *B. tequilensis*, em especial, é mostrada como sendo produtora de pectinases (CHILIVERY; LINGA, 2014; CHILIVERI; KOTI; LINGA, 2016; KOSHY; DE, 2019; ZHANG et al, 2019), proteases (COSTA, 2005; SILVA, 2011;

KHAN et al., 2019), celulasas (WANG et al, 2014), amilases (TIWARI et al, 2014), xilanases (KHANDEPARKER; PARAB; AMBERKAR, 2017) e lipases (RANI; JAGTAP, 2019), dentre diversos outros exemplos de espécies dentro do gênero *Bacillus*.

A taxonomia das bactérias se dá de forma polifásica, onde se utilizam de características fenotípicas como provas bioquímicas (uso de diferentes tipos de açúcares, aminoácidos e ácidos inorgânicos, produção de catalase ou oxidase, redução do nitrato, hidrólise de substratos complexos), provas fisiológicas (faixa de temperatura e pH de crescimento e temperatura e pH ótimos, crescimento em condição de alta salinidade, osmolaridade ou anaeróbica) e de diferenciação celular (forma, tamanho, dimensões e pigmentação celular e da colônia, sorotipagem), além de características genotípicas (<97% de similaridade na sequência do DNAr 16S, plasmídeos, *fingerprints* de DNA, hibridização DNA-DNA, sequenciamento de genes específicos e % de GC) para se diferenciar as espécies (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Desta forma, o gênero *Bacillus* consiste de bactérias que são Gram-positivas, heterotróficas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (mas nunca anaeróbios estritos), com formato celular de bastonetes retos ou levemente curvados, polos arredondados ou formando um ângulo reto, células isoladas ou formando pares ou cadeias de até mais de 30 células e que apresentam motilidade (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

As bactérias deste gênero formam endósporos citoplasmáticos com formato cilíndrico, elipsoidal, oval, esférico ou em formato de rim, com posição central, paracentral, subterminal, terminal ou lateral e tamanho e superfície específicas, os esporângios têm formas características do gênero e podem liberar os esporos quando maduros, as células possuem dimensões variáveis de 0,5 x 1,2 µm ou de 2,5 x 10 µm (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

O citoplasma pode ser vacuolado ou não, há a presença ou não de corpos paraesporais ou cristais de proteína com morfologia variável, o tipo de ácido N-acetilmurâmico (mureína) predominante na parede celular é o meso-diaminopimérico (meso-DAP), as bactérias são catalase positivas, e a fermentação homolática, oxidase e redução de nitrato são variáveis, por fim, a % de GC é de 32-69% (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Este gênero possui características fenotípicas variadas, o que inclui diferenças de necessidades nutricionais, diversidade metabólica, condições ótimas de crescimento e composição genética e embora *Bacillus* tenham sido extensivamente estudados, é geralmente reconhecido que a taxonomia do grupo é insatisfatória (ASH et al., 1991; GATSON et al., 2006).

Em 1973 tentou-se distribuir *Bacillus* em 3 grupos baseado na forma do endósporo e esporângio, onde o grupo 1 era de esporângios elipsoides ou cilíndricos, o grupo 2 de esporos elipsoides que dilatam a parede celular e o grupo 3 de esporos esféricos que dilatam a parede (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Em 1991, Ash et al. compararam sequências de DNAr 16S de 51 espécies de *Bacillus* e dividiram o gênero em 5 grupos distintos, mostrando que o grupo é heterogêneo e filogeneticamente diverso. O grupo de RNA 1 (*Bacillus sensu stricto*) é o maior grupo e é composto pela espécie-tipo *Bacillus subtilis* e outras 27 espécies. Este grupo possui internamente dois clados distintos, sendo um deles formado pelas espécies *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, entre outros. No trabalho de Gatson et al. (2006), *B. tequilensis* 10b formou um grupo monofilético com *B. mojavensis* KL-198, *B. licheniformis* KL-164, *B. subtilis* 168 e *B. atrophaeus* JCM 9070T, justificando a inserção desta espécie neste grupo. Cihan et al. (2012) detectaram 4 linhagens que foram divididas nos grupos de *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. smithii*.

O grupo 2 é composto por *B. jiusiformis*, *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus* e *B. sphaericus*, o grupo 3 por *B. macerans* e 9 outras espécies, o grupo 4 por *B. laterosporus* e *B. brevis* e o grupo 5 por *B. stearothermophilus*, *B. kausiophilus* e *B. thermoglucosidasius*. Nielsen et al. (1994) descreveram ainda um sexto grupo, composto por *Bacillus* alcalifílicos.

Membros de *Bacillus* são notoriamente difíceis de serem diferenciados fenotipicamente, por vezes só sendo possível a partir de fatores como produção de ácidos, disposição de células, posição do endósporo, pigmentação, uso de açúcares, produção de compostos ou crescimento anaeróbico. Já foi sugerido o uso de técnicas moleculares (sequenciamento do gene de DNAr 16S ou do gene *sodA*) em conjunto com análise de ácidos graxos, perfil de PGFE e hibridização DNA-DNA para se poder diferenciar os membros do subgrupo de *B. subtilis* e as suas diferentes cepas (GATSON et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade e as características fisiológicas de bactérias termofílicas e termotolerantes isoladas do solo da caatinga da região de São João do Cariri, Paraíba.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados de bactérias e construir uma árvore filogenética dos mesmos utilizando as sequências de DNAr 16S dos isolados analisados e as sequências da base de dados do GenBank;
- Determinar a temperatura mínima, ótima e máxima de crescimento dos isolados bacterianos;
- Analisar a produção de celulases, amilases, pectinases, proteases, quitinases e lipases pelos isolados bacterianos através da degradação de substratos específicos em meios sólidos;
- Analisar o uso de diferentes tipos de açúcares e ácidos orgânicos como fonte de carbono pelos isolados de bactérias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados de bactérias

Neste trabalho foi utilizada uma coleção de 28 isolados de bactérias denominadas “T_” isoladas de um solo da caatinga da região do São João de Cariri (7°25’S, 37°30’W), Paraíba, obtida no ano 1995 (GORLACH-LIRA, 1999). A coleção pertence ao Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As bactérias foram isoladas como foi descrito no trabalho de Gorlach-Lira (1999). Brevemente, foi utilizado o método de diluições decimais seriais e plaqueamento no meio ágar nutriente dez vezes diluído (NB/10 – Nutrient Broth/10) (composto por 0,25% de caldo nutriente (HiMedia) e 1,5% de ágar bacteriológico (IONLAB)) e meio ágar com extrato de levedura-peptona-extrato de solo (YPS) (BUNT; ROVIRA, 1955) Após a incubação em temperatura 55°C as bactérias foram isoladas, purificadas e estocadas em tubos com meio ágar nutriente semissólido (HiMedia) e em microtubos com água destilada estéril.

As bactérias da coleção foram obtidas do solo de uma área de caatinga com vegetação do tipo lenhosa e do tipo herbácea distribuída de forma dispersa, dominadas pelas espécies *Aspidosperma pyrifolium* Mart., *Croton sonderianus* Muell. Arg., *Opuntia* spp., *Sida* sp. e gramínea *Aristida adscensionis* (GORLACH-LIRA, 1999).

4.2. Cultivo e purificação de bactérias

Foi realizado o cultivo de isolados de bactérias em placas de Petri com meio Ágar Nutriente (Kasvi) utilizando a alça bacteriológica e técnica de esgotamento para finalidade de verificar a pureza dos isolados do estoque (Figura 8). Os isolados foram incubados em estufa a 37°C por 48h, e foi feita a verificação do crescimento e pureza das colônias obtidas.

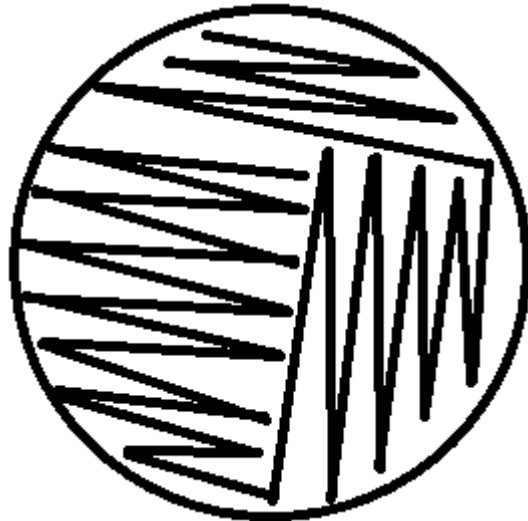


Figura 8. Método de purificação de isolados pelo método de esgotamento.

4.2.1. Extração e purificação do DNA genômico de isolados de bactérias

Foi realizada a extração de DNA genômico de 28 isolados de bactérias. O procedimento foi feito em seguintes etapas:

- a) Inoculação dos isolados em 10 ml de meio líquido de caldo nutriente e incubação em estufa à 37°C por 24h;
- b) Centrifugação das culturas a 8000rpm por 10min a 22°C e, posteriormente, separação do sobrenadante e do pellet contendo a massa celular, descartando o material sobrenadante;
- c) Ressuspensão de células em 1ml de água destilada estéril e armazenamento em freezer (à aproximadamente -20°C).

A extração e purificação do DNA das amostras de células foi feita com o kit HiPurA® Multi-Sample DNA Purification Kit (HiMedia), conforme as recomendações do fabricante, para 15 dos isolados (T1, T4, T5, T10, T11, T13, T21, T25, T27, T28, T33, T40, T42, T43 e T44) e do protocolo e kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit para os outros 13 isolados (T7, T12, T14, T15, T17, T19, T22, T29, T30, T31, T35, T39 e T45), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras do DNA foram congeladas em freezer a -20°C.

Após o processo de extração do DNA genômico, foi realizada a análise da quantidade e pureza do DNA extraído utilizando um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Foi feita também a análise da quantidade e integridade do DNA extraído por meio de eletroforese das amostras em gel de agarose 1% submerso em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), contendo o corante fluorescente GelRed (0,1 µl/ml) à 100V e 70mA por 30min. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 50pb (Invitrogen).

4.2.2. Amplificação do gene DNAr 16S dos isolados de bactérias

O DNA extraído foi utilizado para amplificação do gene de DNAr 16S por PCR para posterior sequenciamento deste gene. Para a PCR foi usado 45µl da solução Master Mix (Ludwig Biotecnologia), segundo as instruções do fabricante, 5 µl de DNA extraído (cerca de 200 ng) e 1 µl de cada primer (50 pmol) (GBT Oligos) por reação de PCR. Os primers universais utilizados (LANE, 1991), derivados de regiões conservadas presentes nas extremidades do DNAr 16S, foram:

- a) primer reverse 1492R (5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3')
- b) primer forward 26F (5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G -3')

A amplificação ocorreu em termociclador (Primus, EUA) nas seguintes condições: 94°C por 5 min, 25 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 2 min e 72°C por 2 min), extensão final a 72°C por 10 min e manutenção a 4°C por no mínimo 15 min. As amostras foram estocadas em freezer à -20°C.

Foi feita a purificação dos produtos da amplificação por PCR utilizando o kit PCR Products Purification Kit (Ludwig Biotecnologia), segundo as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada análise da quantidade e qualidade de amostras amplificadas de DNAr 16S por PCR com o uso de um aparelho de espectrofotômetro NanoDrop® para verificar a sua concentração (DO 260 nm) e pureza (a razão das absorbâncias a 260 nm/280 nm é usada para verificar a pureza do DNA/RNA, onde uma razão de ~1,8 é aceita como sendo uma amostra “pura” para o DNA e uma razão de ~2.0 é aceita como sendo pura para RNA. Se esta razão for menor do que isto, pode sugerir a contaminação por proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem mais a 280 nm e a razão 260/230 é usada como medida secundária para

verificar a pureza dos ácidos nucléicos, onde uma razão de ~2,0-2,2 é considerada boa. Se esta razão for menor do que isto, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem mais na frequência de 230 nm, como carboidratos, EDTA, fenol, TRIzol (uma solução fenólica), cloreto de guanidina ou tiocinato de guanidina).

O DNA amplificado e purificado foi examinado por eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão TBE, utilizando o corante fluorescente GelRed (0,1 µl/ml). a 100V e 70mA por 30min (Figura 9). Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotecnologia) para visualizar a presença de uma única banda com cerca de 1500pb.

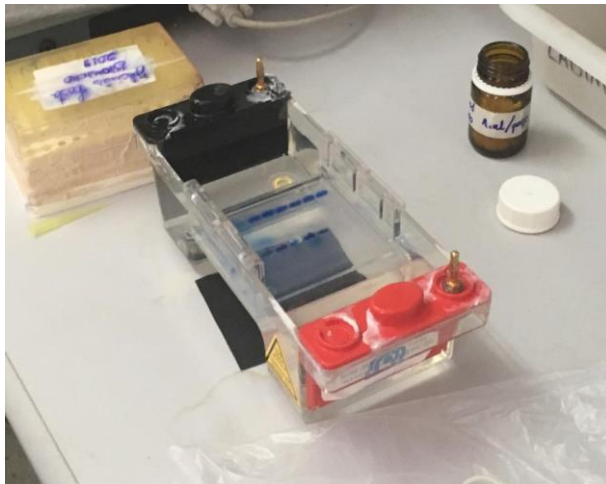


Figura 9. Eletroforese de amostras do DNAr 16S dos isolados de bactérias em gel de agarose. Fonte: Próprio autor, 2020.

4.2.3. Sequenciamento do gene DNAr 16S dos isolados de bactérias

O sequenciamento de amostras de DNAr 16S amplificadas foi realizado na Plataforma de Sequenciamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife-PE, utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando o primer forward 26F (5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G -3'). Desta forma foram obtidas as sequências do gene DNAr 16S, de aproximadamente 600pb.

A qualidade de sequências geradas foi analisada utilizando o programa BioEdit 7.2 (HALL, 1999; ALZOHAIRY, 2011).

As sequências foram submetidas à consulta de similaridade com os dados depositados no GenBank acessado através do site do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa BLASTn - “Nucleotide BLAST - Basic Local Alignment Search Tool”, para a identificação a nível de espécie dos isolados (ALTSCHUL et al., 1997).

O banco de dados utilizado para a busca foi o banco de dados de sequências referência de RNA ribossomal 16S (Bacteria e Archaea - “refseq_rna”) do NCBI. A busca foi feita com o expect threshold padrão de 10 e utilizando o Megablast, que é otimizado para sequências altamente similares (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997; ZHANG et al., 2000; CAMACHO et al., 2009).

As sequências com mais de 97% de similaridade foram consideradas válidas. O alinhamento múltiplo das sequências e a construção da árvore filogenética foram realizados através do programa MEGA X versão 10 (TAMURA et al., 2013; KUMAR et al., 2018), a partir de análise de *neighbor joining tree* (maximum likelihood) (SAITOU; NEI, 1987) baseado nos parâmetros do modelo evolutivo JC (JUKES; CANTOR, 1969), suportado por valores de bootstrap e baseado em uma análise de 1.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

4.2.4. Análise de crescimento de isolados bacterianos em diferentes temperaturas

Os isolados bacterianos foram testados para crescimento em temperaturas de 25°C e 70°C no trabalho de Gorlach-Lira (1999). Os isolados foram inoculados em meio NB/10 suplementado com 0,1% de extrato de levedura e incubados em estufa bacteriológica por uma semana nas respectivas temperaturas testadas (entre 25°C e 70°C, em intervalos de 5°C). Para cada isolado foi determinado a temperatura ótima e máxima de crescimento, e para a maioria dos isolados termofílicos também foi determinado a temperatura mínima de crescimento.

4.2.5. Análise da atividade enzimática dos isolados de bactérias do solo da caatinga

Todos os isolados bacterianos foram testados quanto à sua produção de enzimas com atividades celulolítica, amilolíticas, pectinolíticas, proteolíticas, quitinolítica e lipolíticas em meio de cultura sólido com ágar contendo os respectivos substratos utilizados para cada tipo de teste enzimático específico, no caso, carboximetilcelulose (CMC) (Sigma), amido de milho (INLAB), pectina cítrica (Oxoid), gelatina (Dr. Oetker), quitina (Sigma) e óleo de cozinha residual (mistura de óleo de girassol e azeite).

Inicialmente os isolados testados foram incubados em meio sólido Ágar Nutriente pH 7,0 por 24h e à 37°C para a obtenção de colônias bacterianas recentes para a realização dos testes.

Nos testes feitos em placa de Petri a inoculação foi feita com o auxílio de uma alça bacteriológica, que foi usada para pegar uma única colônia isolada do cultivo em Ágar Nutriente e foi inoculada em um único ponto da placa de Petri, onde cada placa tinha até três inóculos de isolados bacterianos diferentes. Nos testes feitos em tubos de vidro, a inoculação foi feita com uso de alça bacteriológica, onde uma única colônia isolada do cultivo em Ágar Nutriente foi inoculada no meio de cultura no tubo e cada tubo continha apenas um único inóculo de um isolado.

Para a visualização dos halos de degradação, as soluções específicas para cada teste foram colocadas sobre as placas de Petri com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e, após o aparecimento dos halos, as soluções já usadas foram descartadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os diâmetros dos halos de degradação do substrato específico foram mensurados em milímetros com o auxílio de uma régua e os resultados foram expressos a partir de uma média aritmética destes valores. No caso de teste de quitinase as profundidades de degradação da quitina nos tubos foram medidas.

A atividade enzimática dos isolados foi considerada como sendo baixa (+) quando o diâmetro da zona de degradação do substrato era de 6-15mm, foi considerada como sendo alta (++) quando o diâmetro era de 16-25mm, e como sendo muito alta (+++) quando o diâmetro era >25mm.

4.2.5.1. Atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi determinada em placas de Petri com meio de cultura composto por 0,1% de carboximetilcelulose (CMC), 0,05% de NaNO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de extrato de levedura (HiMedia), 1,5% de ágar bacteriológico (IONLAB); pH 7,0 (TEATHER; WOOD, 1982). As placas de Petri inoculadas foram incubadas à 50°C durante 4 dias em estufa bacteriológica.

Após o cultivo, uma solução de corante vermelho Congo (1mg/ml). foi colocada na placa de Petri com cultura bacteriana por 15min e em seguida uma solução de 1M NaCl por 15min. A presença do halo amarelo ao redor da colônia bacteriana indicou a hidrólise de CMC.

4.2.5.2. Atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada em placas de Petri com meio de cultura composto por 0,2% de amido de milho, 0,05% de NaNO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5% de ágar bacteriológico (IONLAB) e pH 7,0. A incubação das placas de Petri inoculadas ocorreu à 50°C para os isolados termófilos, durante 4 dias em estufa bacteriológica. Foi adicionado solução de iodo (1,0 g de I_2 ; 2,0 g de KI e 300 ml de água destilada) às placas para a visualização dos halos resultantes da hidrólise do substrato de amido de milho (SMIBERT; KRIEG, 1994).

4.2.5.3. Atividade pectinolítica

A atividade pectinolítica foi determinada em placas de Petri de vidro com meio de cultura composto por 0,5% de pectina cítrica (Oxoid), 0,1% de extrato de levedura (HiMedia), 0,3% de KH_2PO_4 , 0,6% de Na_2HPO_4 , 0,01 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,014% de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,5% de ágar bacteriológico (IONLAB) e pH 7,0, de acordo com Hankin, Zucker e Sands (1971).

Os ensaios foram feitos em meios de cultura com pH 5,0 e 8,0, utilizando tampão acetato e tampão fosfato respectivamente. O meio com pH 5 foi usado para testar a

atividade de pectina hidrolase (poligalacturonases) e o meio com pH 8,0 para atividade de pectina liase (HANKIN; ZUCKER; SANDS, 1971).

As culturas de bactérias foram incubadas à 50°C durante 4 dias em estufa bacteriológica. Posteriormente, foi adicionado solução de iodo para a visualização dos halos brancos em volta da colônia bacteriana, resultantes da degradação do substrato de pectina.

4.2.5.4. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada em placas de Petri com meio de cultura composto por 2% de gelatina, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, 0,01% de NaCl, 0,01% de CaCl₂, 0,05% de KH₂PO₄, traços de FeSO₄, 1.5% de ágar bacteriológico (IONLAB) e pH 7,0 (STRZELCZYK; GORLACH; RÓZYCKI, 1990).

As placas de Petri inoculadas foram incubadas à 55°C por 2 dias em estufa bacteriológica para os isolados termofílicos.

Para visualizar a degradação de gelatina foi utilizado o reagente de Frazier (12g de HgCl₂, 12ml de HCl concentrado e 80ml de água destilada, onde, para o preparo desta solução o HgCl₂ é misturado ao HCl e posteriormente dissolvido na água destilada e acondicionado em um frasco escuro) (SMIBERT; KRIEG, 1994). Uma alíquota de reagente de Frazier foi adicionada a placa de Petri com cultura bacteriana e devido a reação entre a solução de Frazier e a gelatina, a desnaturação da gelatina torna o meio esbranquiçado e os halos de hidrólise de gelatina transparentes.

4.2.5.5. Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada em placas de Petri utilizando o meio de cultura Rodamina B ágar descrito por Kouker e Jaeger (1987), com algumas modificações. O meio foi composto por 20ml de uma solução do corante Rodamina B (0,050 g de Rodamina B e 50 ml de água destilada esterilizada – 1mg/ml), esterilizada por filtração com filtro de seringa millipore 0,22µm; uma emulsão de água e óleo (30 ml de óleo de cozinha residual, 50 ml de água destilada e 250 µL de Tween 80) da qual utilizamos 50ml para cada 450ml de meio de cultura básico: 4,5 g de caldo nutriente (HiMedia),

1,25 g de extrato de levedura (HiMedia), 10,0 g de ágar bacteriológico (IONLAB), 450 ml de água destilada e pH 7,0. O óleo de cozinha residual (mistura de óleo de girassol e azeite) utilizado no meio foi o óleo resultante da fritura de alimentos no uso domiciliar.

Após dois dias de incubação das culturas bacterianas em estufa bacteriológica à 37°C e à 50°C a produção de lipases foi verificada através da formação de halos fluorescentes e alaranjados através da irradiação das placas de Petri por uma luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 350 nm. As cepas de bactérias que não produzem lipases não apresentam a fluorescência laranja.

4.2.5.6. Atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Lingappa e Lockwood (1962), onde os ensaios foram feitos em tubos de vidro com rosca com meio de cultura composto por 0,5% de quitina coloidal, 0,1% de NH_4Cl , 0,1% de K_2HPO_4 , 1 ml de elementos traço (solução a 0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1,5% de ágar bacteriológico (IONLAB) e pH 7,0. Os tubos inoculados foram incubados à 26°C por 14 dias e a profundidade do clareamento do meio nos tubos com crescimento bacteriano foram medidas em milímetros.

4.2.6. Avaliação da capacidade de uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono

A capacidade de uso de carboidratos e sais orgânicas por isolados bacterianos como fonte de carbono foi determinada no trabalho de Grudzinska (2005).

Brevemente, esse teste foi realizado em placas de Petri com meio de cultura mineral sólido básico composto por 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02% de KCl , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de extrato de levedura (HiMedia), 0,0006% de púrpura de bromocresol, 2,2% de ágar bacteriológico (IONLAB); pH 7,0 (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Utilizou-se 15 ml de solução de púrpura de bromocresol a 0,04% para cada litro de meio básico. As soluções dos carboidratos (celobiose, frutose, galactose, lactose, manose, rafinose, xilose e salicina) foram preparadas separadamente (5g em 10 ml de água) e esterilizados por filtração através de filtros de membrana. A solução de carboidrato foi adicionada asépticamente ao meio de

cultura antes do plaqueamento. As placas de Petri inoculadas foram incubadas à 30°C por 7 dias para os isolados termofílicos em estufa bacteriológica. A formação de ácidos a partir dos carboidratos foi observada pela mudança de cor do meio de cultura, de uma cor violeta para uma cor amarela (reação positiva).

O ensaio da capacidade de uso de sais orgânicos pelos isolados bacterianos como fonte de carbono foi feito em placas de Petri e vidro com meio de cultura mineral sólido básico para o tipo de teste, composto por 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02% de KCl, 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de extrato de levedura (HiMedia), 0,228% de citrato de sódio dihidratado ou de succinato de sódio hexa-hidratado, 2,2% de ágar bacteriológico (IONLAB) e pH 6,8-7,2 (GIBSON; GORDON, 1974). Foram dissolvidos 12,5 ml de púrpura de bromocresol em 2 ml de etanol 95% e esta solução foi adicionada ao meio de cultura antes da esterilização. As placas de Petri inoculadas foram incubadas a 30°C por 7 dias para os isolados termofílicos em estufa bacteriológica. A mudança de cor do meio de cultura de uma cor amarela para uma cor vermelha indica o resultado positivo do uso dos sais orgânicos como uma fonte de carbono pelos isolados bacterianos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação e análise filogenética de isolados de bactérias

Neste trabalho foram analisados 28 isolados de bactérias denominadas “T_” isoladas do solo de caatinga da região de São João do Cariri – PB. Algumas análises foram realizadas com todos os isolados (análise filogenética, faixa de temperatura de crescimento e os testes de produção enzimática), enquanto outras foram feitas com número menor de isolados (testes de uso de açúcares, de uso de ácidos orgânicos e de resistência a antibióticos).

Inicialmente, os isolados foram submetidos ao procedimento de reativação e purificação utilizando as culturas do estoque em ágar nutriente semissólido ou em suspensão de células em água destilada estéril obtendo as culturas puras. A Figura 10 mostra, como exemplo, as culturas de dois isolados obtidos pela técnica de esgotamento.

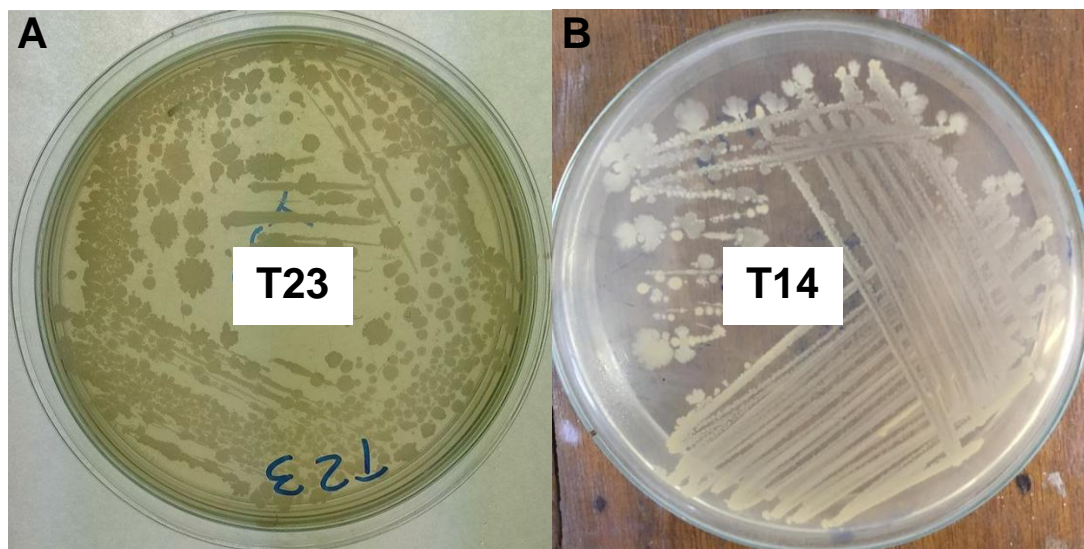


Figura 10. Isolados T23 e T14 inoculados em placa de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente utilizando a técnica de esgotamento. Fonte: Próprio autor, 2020.

Os 28 isolados de bactérias foram submetidos a extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene de DNAr 16S.

Para a verificação da concentração e da pureza tanto do DNA extraído quanto após ele ter passado pelo processo de amplificação e purificação, foram feitas medições com o aparelho de espectrofotômetro Nanodrop® e visualização de amostras de DNA por meio de eletroforeses em gel de agarose. Os valores de concentração de DNA obtidos variaram entre 3,1ng/μl e 196,0 ng/μl, com os isolados T29 e T30 tendo o menor e o maior valor, respectivamente. Quanto à razão entre as absorvâncias 260/280, os valores variaram entre 0,75 e 3,18, com os isolados T40 e T29 tendo respectivamente o menor e maior valor e, por fim, com relação aos valores de razão entre as absorvâncias 260/230, os valores variaram entre 0,12 e 2,40, com os isolados T29 e T15 tendo o menor e maior valor, respectivamente (Tabela 1).

Os valores de DNAr 16S amplificado variaram entre 13,8ng/μl e 39,9,0 ng/μl, com os isolados T29 e T14 tendo o menor e o maior valor, respectivamente. Quanto à razão entre as absorvâncias 260/280, os valores variaram entre 1,54 e 1,92, com os isolados T19 e T22 tendo o menor e maior valor, respectivamente. Por fim, com relação aos valores de razão entre as absorvâncias 260/230, os valores variaram entre 0,06 e 1,75, com os isolados T22 e T13 tendo o menor e maior valor, respectivamente (Tabela 2).

Com relação às eletroforeses em gel de agarose, apesar de alguns isolados terem apresentado as concentrações relativamente baixas, todos os isolados demonstraram fluorescência quando expostos à radiação UV e as bandas das amostras se apresentaram do tamanho esperado (Figura 11). Após o processo de amplificação por PCR e de purificação do DNAr 16S, as bandas permaneceram nas posições esperadas e a fluorescência de todos os materiais genéticos se apresentou de forma bem mais acentuada (Figura 12).

Tabela 1. Quantidade e pureza do DNA genômico extraído dos isolados de bactérias do solo de caatinga.

Isolado	DNA (ng/μl)	260/280¹	260/230²
T1	23,2	0,94	0,87
T4	19,7	0,85	1,05
T5	15,3	0,87	0,91
T7	47,9	1,58	0,98
T10	21,8	0,86	1,07
T11	19,5	0,84	1,09
T12	178,2	1,85	0,74
T13	26,1	0,97	1,16
T14	52,5	1,61	1,15
T15	43,7	1,98	2,40
T17	21,5	1,60	0,82
T19	131,0	1,53	0,84
T21	26,6	0,78	0,63
T22	60,9	1,62	1,43
T25	19,9	0,86	1,09
T27	27,7	1,02	1,29
T28	28,6	0,99	1,10
T29	3,1	3,18	0,12
T30	196,7	1,7	0,76
T31	18,9	1,79	0,42
T33	17,5	0,79	1,02
T35	31,0	1,73	1,83
T39	73,3	1,35	0,66
T40	10,6	0,75	0,84
T42	64,3	1,50	1,68
T43	65,0	1,58	1,69
T44	14,7	0,87	0,90
T45	36,0	1,67	1,32

¹ – Razão entre as absorvâncias a 260 nm/280 nm ² – Razão entre as absorvâncias a 260 nm /230 nm. Fonte: Próprio autor, 2020.

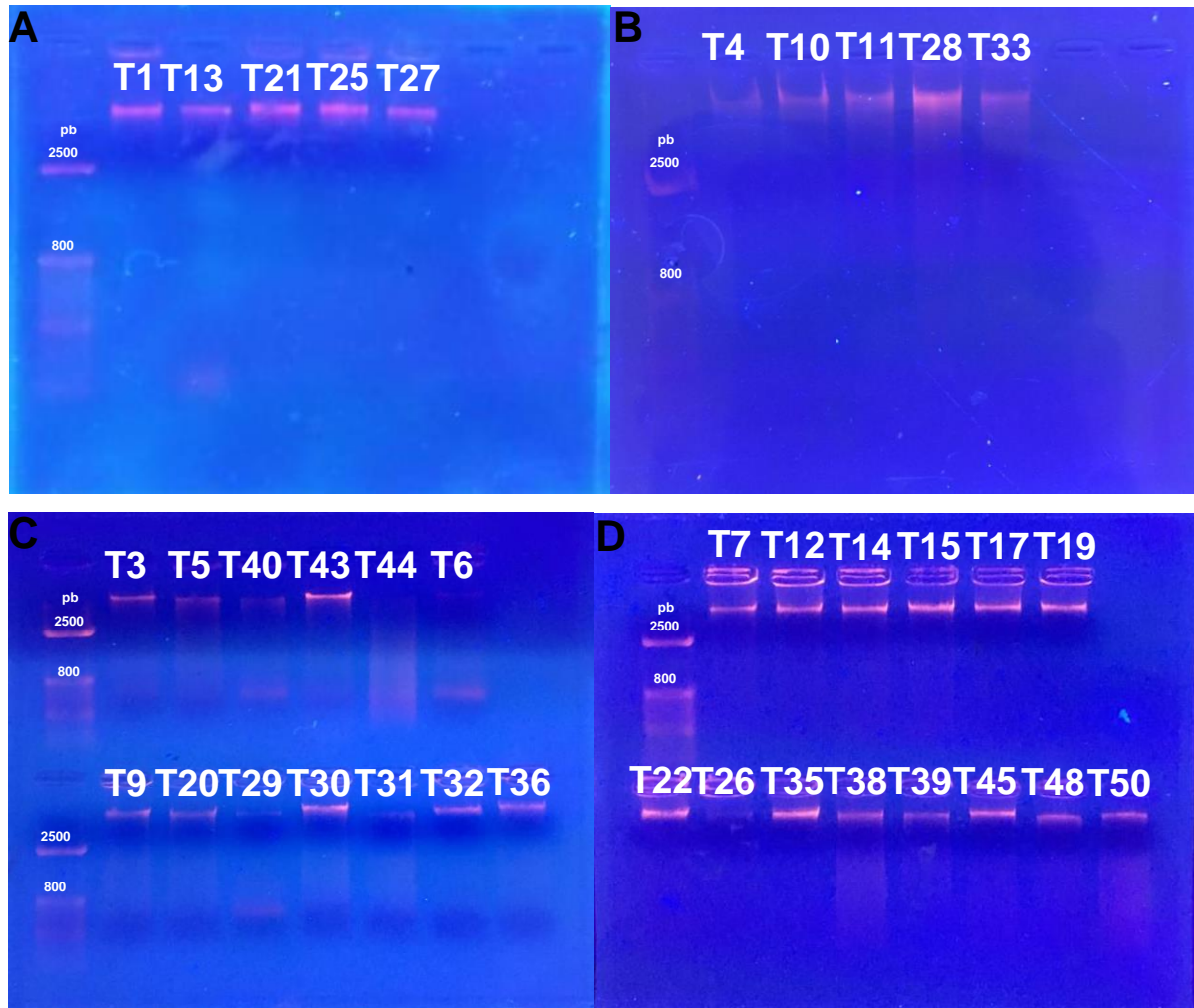


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA genômico extraído dos isolados bacterianos do solo de caatinga. Fonte: Próprio autor, 2020.

Tabela 2. Quantidade e pureza de DNAr 16S amplificado dos isolados de bactérias do solo de caatinga.

Isolado	DNA (ng/μl)	260/280¹	260/230²
T1	21,6	1,78	0,16
T4	34,8	1,76	0,80
T5	26,2	1,73	1,47
T7	31,3	1,89	0,11
T10	30,4	1,85	1,13
T11	33,8	1,80	0,13
T12	36,7	1,79	0,35
T13	24,4	1,80	1,75
T14	39,9	1,81	1,19
T15	30,6	1,87	0,43
T17	28,0	1,81	0,06
T19	30,9	1,54	0,43
T21	26,4	1,77	1,29
T22	31,6	1,92	0,06
T25	23,4	1,88	1,17
T27	27,3	1,85	1,05
T28	20,9	1,79	0,66
T29	13,8	1,82	0,23
T30	38,7	1,81	0,07
T31	24,5	1,81	0,97
T33	32,3	1,82	0,97
T35	34,2	1,76	0,64
T39	23,5	1,86	1,68
T40	18,5	1,75	0,78
T42	27,1	1,75	0,37
T43	28,3	1,61	0,64
T44	15,5	1,75	1,19
T45	15,4	1,86	0,25

¹ – Razão entre as absorvâncias a 260 nm/280 nm ²– Razão entre as absorvâncias a 260 nm /230 nm. Fonte: Próprio autor, 2020.

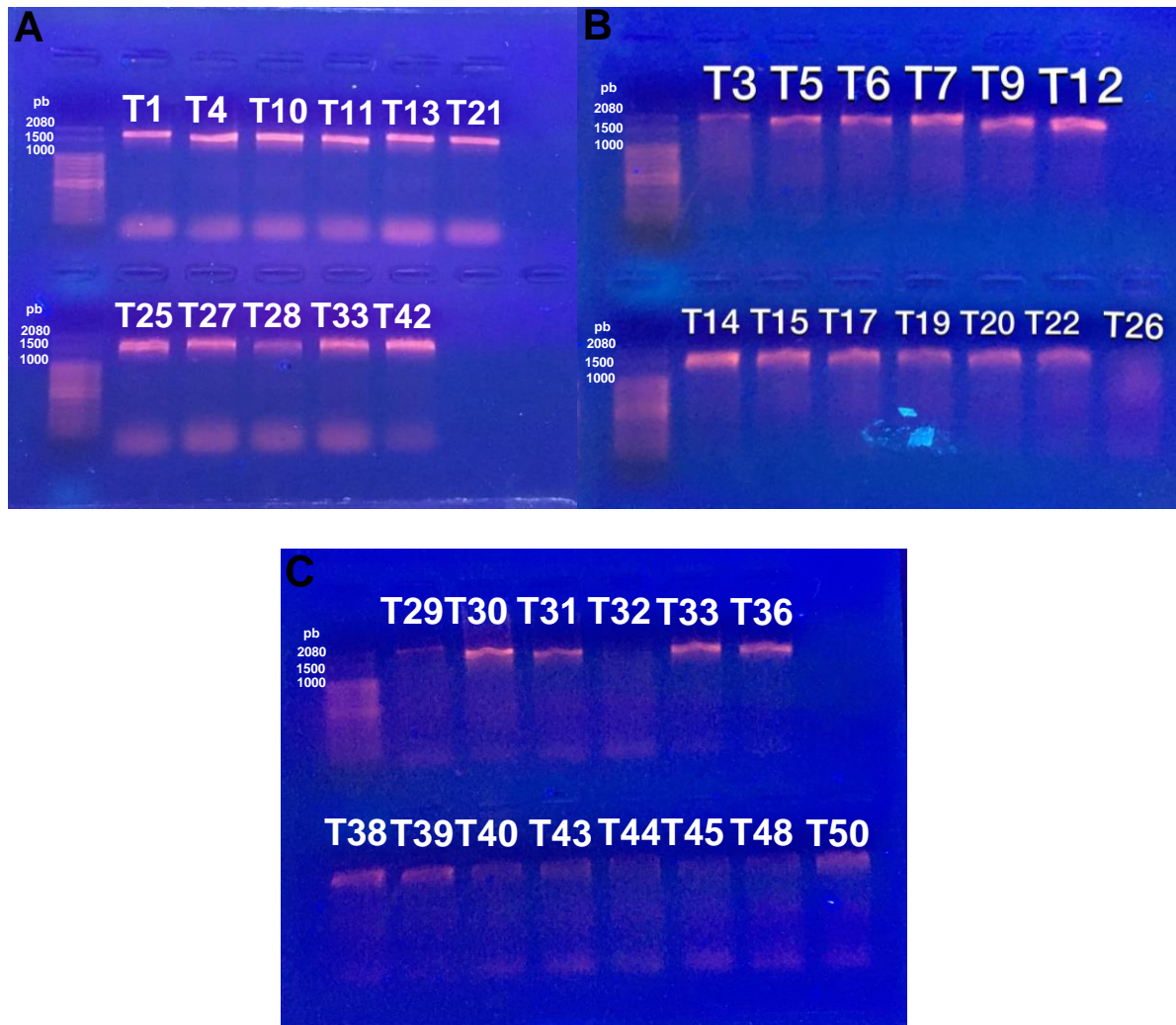


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose do gene DNAr 16S amplificado por PCR e purificado dos isolados bacterianos do solo de caatinga. Fonte: Próprio autor, 2020.

Os valores das medidas da absorvância de um espectrofotômetro incluem a medida de absorvância de todas as moléculas na solução analisada que conseguem absorver no comprimento de onda do espectro de luz utilizada. Uma vez que todos os nucleotídeos de DNA (dsDNA e ssDNA) e RNA absorvem à 260nm, todos eles irão contribuir para a absorvância total da amostra que está sendo analisada, logo, isto mostra o porquê é necessário fazer a purificação das amostras de DNA antes de realizar a medição no espectrofotômetro, e isto foi algo que se demonstrou nos nossos dados de NanoDrop®.

Outras coisas que podem alterar, por exemplo, o valor da razão 260/230 é a própria medida de acurácia de comprimento de onda do aparelho de espectrofotômetro

utilizado e o pH da solução analisada (a razão varia em - 0,2-0,3 em valores de pH ácido e em + 0,2-0,3 em valores de pH alcalino). Além disso, os nucleotídeos que compõem o DNA/RNA possuem, cada um, razões 260/280 distintas (guanina: 1.15, adenina: 4.50, citosina: 1.51, timina: 1.47 e uracila: 4.00) Logo, a razão 260/280 final da amostra se trata na realidade de uma média das razões para os 4 nucleotídeos presentes numa dada amostra de nucleotídeos. Os valores amplamente aceitos como amostras “puras” se tratam apenas de estimativas, uma vez que a razão real irá depender da composição de nucleotídeos do ácido nucleico analisado. O RNA, por exemplo, tem um valor de razão 260/280 maior do que o DNA pois o valor desta razão para a uracila é muito maior que o valor da timina, que é a base nucleotídica presente no DNA.

A razão 260/230 é usada como medida secundária para verificar a pureza dos ácidos nucléicos, onde uma razão de ~2,0-2,2 é considerada boa e os valores dessa razão para amostras puras são no geral maiores do que os valores de 260/280, como pôde ser observado para alguns dos nossos isolados.

A partir do alinhamento da sequência parcial do DNAr 16S que foi sequenciada, foi possível identificar no programa BLASTn as espécies que mais se assemelham com os isolados bacterianos provenientes do solo da caatinga do Cariri paraibano, cujos resultados estão dispostos na Tabela 3. Foram considerados os resultados do BLASTn com as maiores porcentagens de identidade (>97%) e os com os valores de E-value mais próximos de 0,0 quanto possível.

Tabela 3. Identificação dos isolados de bactérias do solo de caatinga baseada nas sequências parciais de DNAr 16S e nos resultados do BLAST.

Isolados	Alinhamento mais significativo	Código de acesso-NCBI	E-value	Identidade Máxima %
T1			4e-155	98,68
T12			6e-97	97,98
T25	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168	NR_102783.2	0,0	97,92
T27			0,0	97,39
T28			9e-157	97,45
T33			0,0	98,17
T43			2e-147	97,31
T4			1e-165	98,16
T5			0,0	99,03
T10			0,0	99,56
T14			0,0	97,42
T15	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118	NR_112116.2	0,0	99,07
T17			0,0	98,28
T21			0,0	99,75
T29			0,0	97,00
T31			0,0	98,99
T40			0,0	97,25
T7				
T11			0,0	98,85
T19			0,0	99,47
T30	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-4219	NR_116183.1	0,0	99,18
T35			4e-175	98,84
T42			0,0	99,46
T44			0,0	98,14
T45			0,0	99,08
T13			0,0	97,71
T22	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b	NR_117611.1	0,0	99,56
T39			0,0	98,09

Fonte: Próprio autor, 2020.

O BLASTn, utilizado neste trabalho, é utilizado para buscas em que os dados de entrada tratam de sequências de nucleotídeos e estas sequências serão comparadas contra um banco de dados também de nucleotídeos. O programa BLAST faz esta busca a partir de alinhamentos locais contra as sequências no banco de dados do NCBI para assim podermos obter as sequências com maior similaridade.

Os resultados do BLASTn mostraram que todos os isolados deste trabalho pertencem ao gênero *Bacillus* do filo *Firmicutes* (Tabela 3, Figura 13). Dos 28 isolados, 25 (89,28%) apresentaram similaridade de 97,00% a 99,75% com a espécie *B. subtilis*. Três isolados (T13, T22 e T39) foram representados pela espécie *B. tequilensis* com a similaridade de 97,71% a 99,56%.

Além de realizar alinhamentos locais, o BLAST também nos dá como um dos seus dados de saída, um valor de “expect value” (e-value), que consiste de uma informação estatística relacionada ao valor de significância de cada alinhamento (CAMACHO et al., 2009). Com relação aos valores de E-value, apenas 6 isolados não tiveram este valor como sendo de 0,0. Tais isolados se trataram de *B. subtilis* T1, T4, T12, T28, T35 e T43, que tiveram, respectivamente, os valores de E-value de 4e-155, 1e-165, 6e-97, 9e-157, 4e-175 e 2e-147, que se tratam de números que são bem próximos de 0,0. Neste tipo de análise, quanto mais perto de 0,0 for o valor de E-value, melhor é a taxa de confiança de que este resultado não se deu simplesmente pela força do acaso, sendo que o resultado de 0,0 se trata do resultado mais ideal possível, pois ele indica que a sequência consultada é exatamente igual a aquela encontrada no banco de dados.

Dentre os isolados de *Bacillus*, os valores de porcentagem de identidade máxima daqueles que apresentaram similaridade com a espécie/cepa *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 variou entre 97,31% e 98,68%. Para os isolados que apresentaram similaridade com a espécie *B. subtilis* IAM 12118, os valores de identidade máxima variaram entre 97,00% e 99,75%. Já para os isolados que apresentaram similaridade com a espécie *B. subtilis* NRRL B-4219, os valores de identidade máxima variaram entre 98,14% e 99,75%. Por fim, para os isolados que foram identificados como sendo da espécie *Bacillus tequilensis* os valores de identidade máxima variaram entre 97,71% e 99,56%.

Com relação à análise filogenética, todos os 28 isolados bacterianos ficaram agrupados no mesmo clado das espécies *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168, *Bacillus subtilis* IAM 12118, *Bacillus subtilis* NRRL B-4219 e *Bacillus tequilensis* 10b, o que reforça a ideia de que estes isolados pertencem no mínimo ao mesmo subgrupo de *Bacillus* do que a espécie-tipo do grupo 1 de RNA de *Bacillus*, (também chamado de subgrupo *Bacillus sensu stricto*), *Bacillus subtilis* (Figura 13).

Este clado teve o suporte de valores de *bootstrap* que chegaram a 40 e o mesmo é grupo-irmão de um clado composto pelas espécies *B. siamensis*, *B. velezensis* e *B. nematocida* (sendo que este grupo, por si só, é suportado por um valor de *bootstrap* de cerca de 54). Estes dois grupos-irmãos, por sua vez, são suportados como tal por valores de *bootstrap* de 39 (Figura 13).

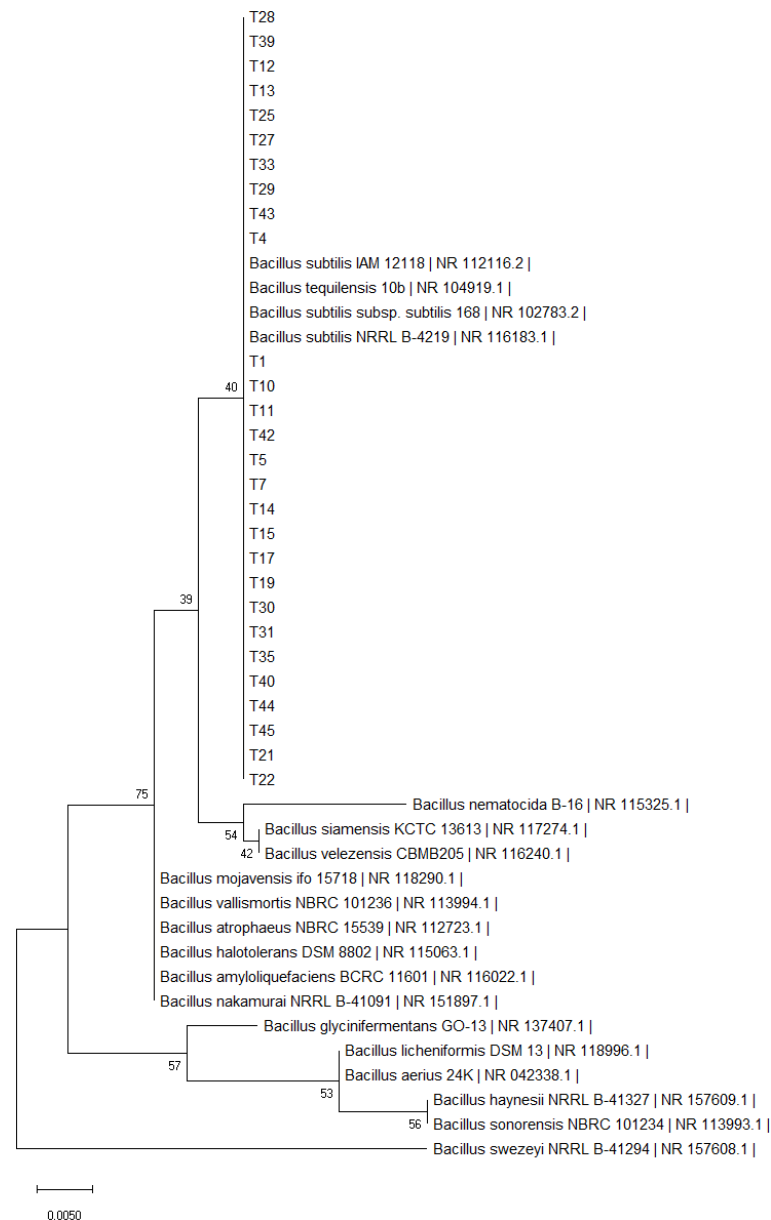


Figura 13. Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* isoladas do solo da caatinga e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de rRNA 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Jukes-Cantor. Os valores de *bootstrap* mostrados na árvore foram obtidos com base em 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostrados em parênteses. Fonte: Próprio autor, 2020.

No artigo de descrição da espécie *B. tequilensis* (GATSON et al., 2006) a espécie foi agrupada numa árvore filogenética de máxima verossimilhança baseadas no gene de DNAr 16S como sendo um grupo irmão do clado composto pelas espécies *B. mojavensis* e *B. licheniformis*, suportado por valores de *bootstrap* de 32. No entanto, nas árvores filogenéticas de máxima verossimilhança da sequência nucleotídica e sequência de aminoácidos do gene *sodA* do mesmo estudo, *B. tequilensis* foi incluído como sendo um grupo irmão de *B. subtilis*, suportado por valores de *bootstrap* de 95 e 60, respectivamente. Isto, aliado a outros testes realizados pelo grupo justificaram a inclusão deste isolado bacteriano como uma nova espécie de *Bacillus* intimamente relacionada a *B. subtilis*.

Tanto o gênero *Bacillus* como um todo quanto também em especial as espécies *B. subtilis* e *B. tequilensis* são conhecidos por produzirem enzimas extracelulares, vários trabalhos diferentes já tentaram avaliar a capacidade de produção enzimática por estas bactérias, a exemplo de enzimas tais como pectinases (CHILIVERY; LINGA, 2014; CHILIVERI; KOTI; LINGA, 2016; KOSHY; DE, 2019; ZHANG et al, 2019), proteases (COSTA, 2005; SILVA, 2011; KHAN et al., 2019), celulasas (WANG et al, 2014), amilases (TIWARI et al, 2014), xilanases (KHANDEPARKER; PARAB; AMBERKAR, 2017), lipases (SILVA; LIMA; PINOTTI, 2014; RANI; JAGTAP, 2019), entre outros.

Com relação a outros estudos de diversidade de bactérias provenientes de clima semiárido, até o presente momento poucos estudos têm sido feitos sobre o assunto. Dos estudos que têm sido feitos na área, alguns fazem referência apenas à contagem de bactérias da área (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; LIMA et al., 2014a) ou à quantidade de biomassa de bactérias do solo (LUNA et al., 2019). Dos poucos artigos que chegam a identificar molecularmente as bactérias de solo do semiárido brasileiro, podemos destacar os trabalhos feitos por Neves (2016), por Costa (2018) e por Grisi (2011). Destes, Neves (2016) e Costa (2018) estudaram a diversidade de bactérias de solo da RPPN Fazenda Tamanduá, uma região de caatinga próximo da cidade de Patos – PB.

Neves (2016) encontrou em seus resultados bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, com 13 gêneros diferentes, sendo *Bacillus* o mais abundante, este incluiu as espécies *Bacillus* sp., *B. cereus* e *B. megaterium*. Ao total, houveram 23 espécies diferentes, com as mais

abundantes sendo *Leifsonia shinshuensis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Micrococcus luteus* e a espécie com a maior representatividade foi *B. megaterium*.

Costa (2018) estudou a diversidade de bactérias de solo da RPPN Fazenda Tamanduá (caatinga do sertão paraibano) e da APA do Cariri (caatinga do cariri paraibano) e obteve como seus resultados que o filo *Firmicutes* foi o filo mais abundante com o gênero *Bacillus* sendo o mais representativo e foram também identificadas espécies como *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *S. maltophilia*, *M. luteus*, *L. shinshuensis*, *Paenibacillus* sp, *Routella* sp. e *Celullomonas* sp., sendo que as espécies *B. cereus*, *E. cloacae* e *Celullomonas* sp. foram as mais representativas no cariri e *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *M. luteus* e *B. megaterium* foram as mais representativas no sertão.

Grisi (2011) avaliou a diversidade dos domínios Bacteria e Archaea em amostras de solo de São João do Cariri – PB na base de análise de bibliotecas metagenômicas e obteve dentre os seus resultados que os filios mais abundantes foram *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* (especialmente bactérias do gênero *Bacillus* e incluído neste grupo houve um total de 3 clones identificados como *B. subtilis*), *Cyanobacteria* e *Planctomycetes* para o domínio Bacteria e os filios *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* para o domínio Archaea. Com isto, podemos corroborar nossos dados de que o filo *Firmicutes* e em especial o gênero *Bacillus* de fato é um grupo muito abundante neste tipo de ambiente e podemos dizer que os nossos dados sobre a presença das espécies *B. subtilis* também foram corroborados pelo trabalho de Grisi (2011) mas que a presença da espécie *B. tequilensis* neste ambiente trata-se de um dado novo sobre a diversidade bacteriana da área.

5.2. Faixa de crescimento de isolados de bactérias do solo de caatinga

Os 28 isolados bacterianos foram analisados quanto à faixa de temperatura de crescimento, determinando à temperatura ótima e máxima de crescimento e para alguns isolados a temperatura mínima (Gorlach-Lira, 1999).

Com relação a temperatura ótima de crescimento, em geral, todos os isolados cresceram melhor à temperatura de 50°C (Tabela 4). Para alguns isolados, como no

caso do isolado *B. subtilis* T5, a temperatura ótima foi de 45 - 50°C, para o isolado *B. subtilis* T28 50-55°C e para o isolado *B. subtilis* T42 50 - 55°C.

Tabela 4. Faixa de temperatura de crescimento dos isolados de bactérias do solo de caatinga.

Isolado	Temperatura de incubação (°C)								
	25	30	40	45	50	55	60	65	70
T1	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T4	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T5	+	+	+	++	++	+	+	-	-
T7	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T10	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T11	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T12	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T13	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T14	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T15	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T17	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T19	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T21	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T22	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T25	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T27	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T28	+	+	+	+	++	++	+	-	-
T29	+	+	+	+	+	+	+	-	-
T30	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T31	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T33	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T35	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T39	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T40	-	-	±	+	++	+	+	-	-
T42	-	±	+	+	++	++	+	-	-
T43	-	-	±	+	++	+	+	-	-
T44	+	+	+	+	++	+	+	-	-
T45	+	+	+	+	++	+	+	-	-

+ crescimento; ++ crescimento ótimo; ± crescimento fraco; - sem crescimento. Fonte: Gorlach-Lira, 1999.

A temperatura máxima de crescimento para todas as bactérias deste estudo foi de 60°C (Tabela 4).

A temperatura mínima foi determinada para os isolados *B. subtilis* T40, T42 e T43, com os valores, respectivamente, de 40°C, 30°C e de 40°C. Desta forma, a faixa de temperatura de crescimento para os isolados *B. subtilis* T40 e *B. subtilis* T43 foi de 40°C a 60°C e para o isolado *B. subtilis* T42 de 30°C a 60°C.

Cada tipo de microrganismo requer um valor ótimo de temperatura para a sua reprodução e desenvolvimento, sendo esse valor dependente das modificações enzimáticas que o organismo apresenta. Dito isto, a depender da faixa ótima de temperatura para o crescimento e atividade microbianas, as bactérias podem ser divididos entre microrganismos considerados psicrófilos (temperatura ótima menor do que 20°C), mesófilos (temperatura ótima entre 20°C e 40°C), termófilos (temperatura ótima maior do que 40°C) e hipertermófilos (crescem em temperaturas acima de 60°C (MADIGAN et al., 2010; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

O crescimento otimizado para as diferentes temperaturas se deve ao fato de que esses organismos possuem modificações adaptativas em seu metabolismo e genomas que possibilitam o seu desenvolvimento nestas condições. Estas adaptações podem se dar, por exemplo, na forma de mudanças conformacionais nas suas proteínas, no grau de saturação dos ácidos graxos da membrana plasmáticas, entre outros (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

No trabalho de Gorlach-Lira e Coutinho (2007) foram avaliadas as faixas de temperatura de crescimento e as temperaturas ótimas de crescimento de bactérias mesofílicas e termofílicas do semiárido e, em seus resultados, a maioria dos isolados mesofílicos cresceram otimamente a 30°C, enquanto a temperatura máxima de crescimento foi de 45 - 50°C, ao passo de que as bactérias termofílicas tiveram a temperatura ótima de crescimento entre 40 - 50°C e a maioria dos isolados cresceram até as temperaturas de 65 - 70°C, de modo que 5 dos isolados analisados foram considerados como sendo microrganismos termófilos *sensu stricto* uma vez que a temperatura de crescimento máxima foi maior do que 55°C e a temperatura mínima de crescimento foi maior do que 30°C, enquanto os outros isolados foram classificados como termotolerantes de acordo com a classificação de Sonnleitner (1983).

Levando isto em conta, os únicos isolados testados no presente estudo que se enquadram na categoria de bactérias termofílicas são de fato os isolados *B. subtilis* T40, T42 e T43, enquanto todos os outros isolados se enquadram na categoria de

microrganismos termotolerantes. Isto faz sentido uma vez que a espécie *B. subtilis*, por exemplo, na realidade é uma bactéria de crescimento do tipo mesófilo. Como o estresse ambiental e a carência de nutrientes é comum nos ambientes em que esta espécie geralmente se encontra (solo e plantas), ela acabou desenvolvendo um conjunto de estratégias que permitem a sua sobrevivência nestes tipos de ambientes mais extremos como é o caso da caatinga. Uma dessas estratégias é, por exemplo, a formação de endósporos de resistência como resposta ao estresse.

5.3. Produção de enzimas extracelulares por bactérias do solo da caatinga

Foi determinada a atividade de enzimas extracelulares dos isolados bacterianos listados na Tabela 5 capazes de hidrolisar carboximetilcelulose, amido de milho, pectina cítrica, gelatina, óleo vegetal residual e quitinase. Os resultados mostraram que todos os isolados produziram pelo menos dois tipos de enzimas extracelulares, com a quantidade mínima de enzimas produzidas sendo o de duas enzimas, com o isolado *B. tequilensis* T39 produzindo protease e lipase a 37°C. O número máximo de enzimas produzidas foi de 5 enzimas (isolados *B. subtilis* T14, T17, T28 e T45 sendo capazes de degradar todos os substratos, com exceção do de quitina) (Tabela 5).

Tabela 5. Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de bactérias do solo da caatinga.

Isolado	Celulase (50°C)	Amilase (50°C)	Pectinase (50°C)	Protease (50°C)	Lipase (37°C)	Lipase (50°C)	Quitinase (50°C)
Halo de hidrólise (mm)							
T1	19,0	-	18,0l/20,0h	27,0	++	-	-
T4	15,0	-	-	17,0	++	+	-
T5	23,0	-	10,0 h	20,0	+	+	-
T7	17,0	-	-	20,0	+	-	-
T10	18,0	23,0	13,0 h	24,0	+	-	-
T11	31,0	31,0	14,0l/18,0h	28,0	+	-	-
T12	26,0	26,0	11,0 l	23,0	+++	+	-
T13	13,0	30,0	15,0l/20,0h	26,0	++	-	-
T14	22,0	21,0	15,0l/19,0h	18,0	++	+	-
T15	15,0	-	12,0 l	28,0	+	-	-
T17	15,0	29,0	10,0 l	25,0	+	+	-
T19	16,0	29,0	-	22,0	+	-	-
T21	21,0	-	9,0 l/12,0 h	9,0	+++	+	-
T22	15,0	-	9,0 l/13,0 h	-	+	+	-
T25	13,0	-	-	28,0	++	-	-
T27	15,0	-	12,0 h	24,0	++	+	-
T28	21,0	34,0	15,0 h	30,0	++	+	-
T29	14,0	-	-	42,0	++	+	-
T30	11,0	-	-	18,0	+	-	-
T31	17,0	-	-	20,0	+	+	-
T33	16,0	17,0	-	35,0	+++	+	-
T35	14,0	22,0	-	23,0	++	-	-
T39	16,0	-	-	-	+++	-	-
T40	-	-	-	30,0	+	+	-
T42	-	-	17,0 l	30,0	++	+	-
T43	-	-	18,0 l	30,0	+++	+	-
T44	12,0	-	13,0 l	26,0	+++	+	-
T45	17,0	42,0	17,0 l	25,0	++	+	-

l - pectina liase pH=8; h - pectina hidrolase pH=5; - ausência de atividade enzimática; atividade enzimática: baixa (+); alta (++); muito alta (+++). Fonte: Próprio autor, 2020.

Dos 28 isolados testados, 26 isolados produziram protease, 25 celulase, treze pectina liase, onze amilase, dez pectina hidrolase (poligalacturonases) (Tabela 5, Figura 14). Com relação as lipases, todos os isolados produziram esta enzima a 37°C

ao passo de que dezessete a produziram na temperatura de 50°C. Nenhum dos isolados foi capaz de degradar o meio com quitina (Tabela 5, Figura 14).

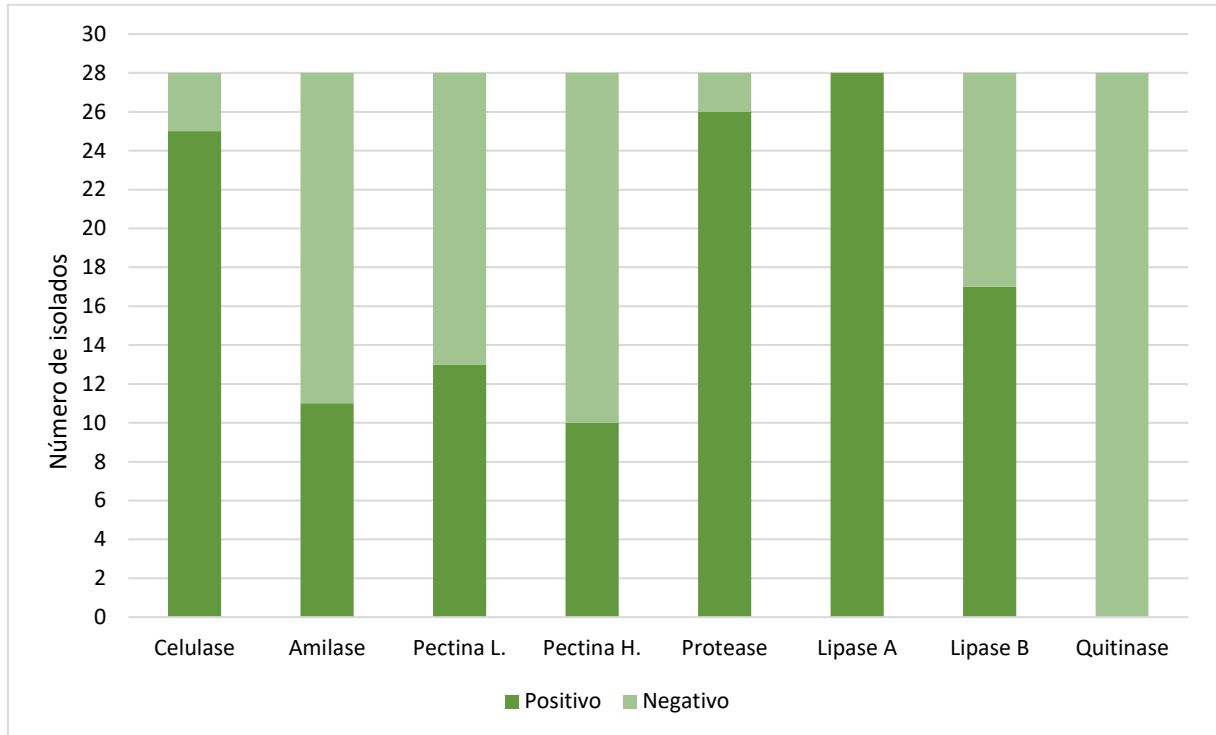


Figura 14. Número de isolados positivos e negativos nos testes de produção de enzimas extracelulares. Pectina L. – pectina liase; Pectina H. – pectina hidrolase; Lipase A – lipase 37°C; Lipase B – lipase 50°C. Fonte: Próprio autor, 2020.

O óleo vegetal residual se provou ser um bom meio para indução da atividade lipolítica dos isolados bacterianos testados, uma vez que todos eles foram capazes de hidrolisar este meio quando incubados a uma temperatura de 37°C e 17 destes mesmos isolados (cerca de 60,71% do total) continuaram a hidrolisar este substrato quando foram incubados a uma temperatura de 50°C (Figura 14), embora com menos intensidade. Óleos vegetais e óleos derivados do petróleo são bons estimulantes da atividade lipolítica de microrganismos (BHARATHI; RAJALAKSHMI; KOMATHI, 2018), o que corrobora com os resultados deste trabalho. Podemos destacar ainda que, sob a radiação ultravioleta, os isolados *B. subtilis* T12, T21, T33, T43 e T44 e *B. tequilensis* T39 foram os que apresentaram os halos alaranjados com a maior intensidade dentre as bactérias testadas (Tabela 5, Figura 15). Com relação a esta intensidade da fluorescência, o corante Rodamina B é capaz de formar um complexo com os ácidos graxos livres liberados a partir da hidrólise dos triacilgliceróis em glicerol

e ácidos graxos. Este complexo Rodamina B-ácidos graxos é o que possui a capacidade de fluorescência quando irradiados com a luz UV e a intensidade desta fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de TAGs hidrolisados, de forma que a emissão de fluorescência é maior quanto maior for a liberação de ácidos graxos.

Com relação a produção destas enzimas pelo gênero *Bacillus*, este gênero se caracteriza como um dos mais importantes gêneros de bactérias produtoras de lipases (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004), a exemplo de espécies como *B. megaterium* (SILVA; LIMA; PINOTTI, 2014) e *B. stearotherophilus* MC 7 (KAMBOUROVA et al., 2003) como sendo produtores de lipases altamente termoestáveis. Além disso, *B. tequilensis* já foi previamente estudada quanto a sua produção de lipases (RANI; JAGTAP, 2019).

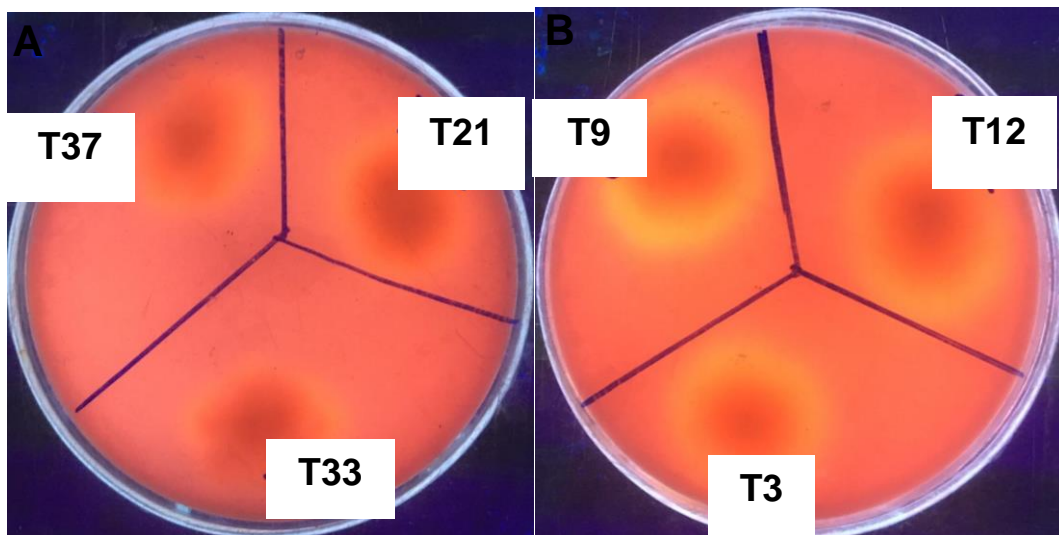


Figura 15. Isolados de bactérias lipolíticas (*Bacillus subtilis* T3, T9, T12, T21, T33 e T37) em meio de cultura com óleo vegetal residual e Rodamina B. As colônias positivas exibem a fluorescência sob irradiação da luz UV. Fonte: Próprio autor, 2020.

No âmbito da atividade celulolítica, este tipo de enzimas extracelulares foi o segundo tipo mais comum produzido pelos isolados deste estudo, de tal forma que 25 dos 28 isolados testados (89,28%) foram capazes de degradar a carboximetilcelulose (Figura 16) e os isolados *B. subtilis* T11 e T12 foram os que apresentaram o maior potencial de hidrólise da celulose pois foram os únicos que exibiram uma zona de

degradação maior do que o valor de 25 mm, com valores de 31,0 mm e 26,0 mm de diâmetro de halos de hidrólise, respectivamente (Tabela 5, Figuras 14 e 16).

Os fungos são os atuais principais produtores das celulases que são propícias para a aplicação em uso industrial, devido à sua alta taxa de secreção para o meio extracelular e da facilidade do processo de extração e purificação destas enzimas (SHARMA; YAZDANI, 2016). Porém, as bactérias também têm se tornado uma fonte importante de enzimas celulolíticas e cada vez mais estudos de bioprospecção tem sido feitos com elas pois elas tem vantagens sobre as células fúngicas, tais como um crescimento muito mais rápido em comparação com os fungos e uma estabilidade tanto da questão celular quanto com relação às enzimas que são excretadas por elas (SHARMA; YAZDANI, 2016; PATEL et al, 2019).

Além disto, diversos gêneros de bactérias têm se mostrado como sendo ótimos produtores de celulases, como é o caso do gênero *Bacillus* (RASTOGI et al., 2010; ZAMBARE et al., 2011; MOHITE; PATIL, 2016). Com relação à produção destas enzimas pelo gênero *Bacillus*, temos que *B. tequilensis* já foi investigado quanto à sua capacidade de produção de enzimas celulases (WANG et al, 2014).

Já com relação aos estudos feitos sobre a produção enzimática de bactérias de clima semiárido, temos que Grisi (2011) identificou 60 clones metagenômicos capazes de degradar a celulose, sendo que destes, 3 foram identificados como pertencendo à espécie *B. subtilis*. Soares et al. (2012) investigaram a presença de bactérias celulolíticas em solos de ambientes extremos como a caatinga e a antártica e obtiveram nos seus resultados que, dos 32 isolados testados, um máximo de 5 conseguiram produzir exoglucanases enquanto que 23 isolados produziram endoglucanases, a depender do meio de enriquecimento utilizado. Lima et al. (2014a) realizaram uma avaliação de bactérias produtoras de celulase a partir da contagem de bactérias celulolíticas em UFC/g. Gorlach-Lira e Coutinho (2007) investigaram a atividade de produção enzimática de bactérias mesofílicas e termofílicas provenientes da caatinga e como parte seus resultados, nenhuma das bactérias termofílicas foram capazes de degradar carboximetilcelulose, enquanto que as bactérias mesofílicas foram capazes de produzir celulases.

A carboximetilcelulose é o substrato de uso preferencial para a triagem de microrganismos secretores de endoglucanases devido a sua baixa cristalinidade e ao

seu alto grau de polimerização (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; FLORENCIO, 2011), porém, este substrato não é específico para as enzimas exoglucanases ou β -glicosidases, o que torna necessário a realização de testes adicionais caso se queira avaliar a atividade destas outras enzimas, como é o caso de testes feitos com os substratos celobiose (como o teste de uso deste carboidrato que foi feito no presente trabalho) ou com a celulose do tipo micro cristalina (SHUANGQI et al., 2011; BEHERA et al., 2017).

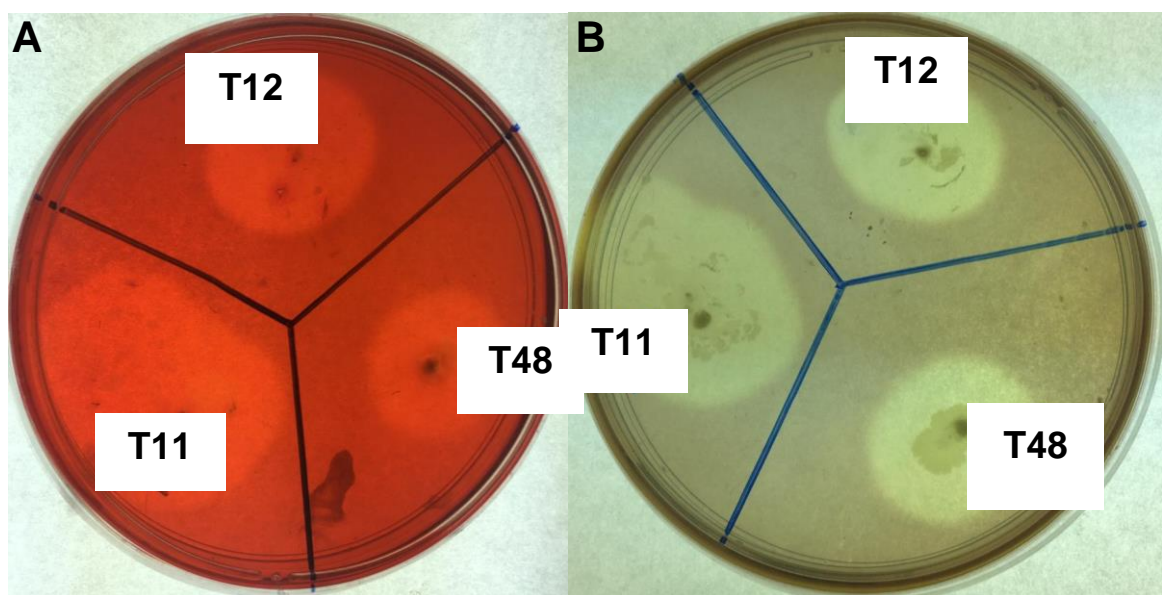


Figura 16. Isolados de bactérias celulolíticas (T11, T12 e T48) em meio de cultura com carboximetilcelulose (CMC). Fonte: Próprio autor, 2020.

No que diz respeito à atividade pectinolítica, dez isolados obtiveram resultado positivo para a pectina hidrolase (poligalacturonase) e 13 para a pectina liase (Tabela 5, Figuras 14 e 17). Do total de 28 isolados, 6 destes conseguiram produzir os dois tipos de pectinases (*B. subtilis* T1, T11, T14, T21 e T22 e *B. tequilensis* T13), enquanto que 7 isolados (*B. subtilis* T12, T15, T17, T42, T43, T44 e T45) conseguiram produzir somente a pectina liase, 4 isolados (*B. subtilis* T5, T10, T27 e T28) produziram apenas poligalacturonases (Tabela 5, Figura 14). Dentre os isolados destaca-se *B. subtilis* T1, T11 e T14 e *B. tequilensis* T13 (Figura 17) para a produção de poligalacturonases por possuírem os maiores halos de hidrólise dos substratos, com valores de diâmetros de 20,0 mm, 18,0 mm, 20,0 mm e 19,0 mm, respectivamente. Já para as enzimas pectina

liases, destacam-se os isolados *B. subtilis* T1, T42, T43 e T45 por possuírem os maiores valores de diâmetro de degradação de substrato, com halos de diâmetro de 18,0 mm, 17,0 mm, 18,0 mm e 17,0 mm, respectivamente.

A maioria das pectinases usadas industrialmente são provenientes de fungos (SINGH; RAMAKRISHNA; APPURAO, 1999) sendo que, destes, a espécie *Aspergillus niger* é a mais comumente usada para este tipo de fim (GUMMADI; PANDA, 2003). No entanto, bactérias também já foram reportadas como sendo produtoras destas enzimas, inclusive aquelas do grupo das actinobactérias (BEG et al., 2000). Outro fato importante sobre a prospecção deste tipo de enzima é que recentemente tem aumentado a demanda pela substituição da pectina cítrica como substrato por substratos derivados de cascas de frutas como uma alternativa mais barata e sustentável para a prospecção dessas enzimas extracelulares (ZEHRA; SYED; SOHAIL, 2020).

Com relação a produção destas enzimas pelo gênero *Bacillus*, temos que a espécie *B. tequilensis* já foi extensivamente utilizada para a produção de pectinases, sob diferentes metodologias e substratos (CHILIVERY; LINGA, 2014; CHILIVERI; KOTI; LINGA, 2016; KOSHY; DE, 2019; ZHANG et al, 2019).

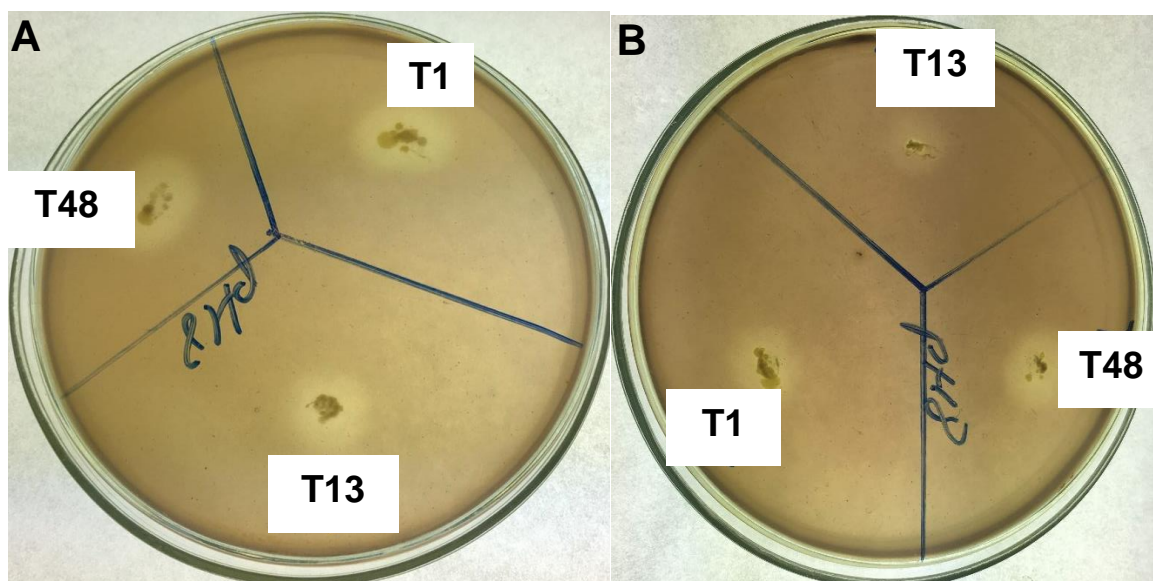


Figura 17. Isolados de bactérias pectinolíticas (T1, T13 e T48) em meio de cultura com pectina cítrica. Fonte: Próprio autor, 2020.

Com relação à degradação do meio de cultura com amido, este foi o teste enzimático em que menos isolados obtiveram resultados positivos, com 11 isolados apresentando a capacidade de hidrolisar este meio (Tabela 5, Figura 14). Dos 11 resultados positivos, 7 tiveram os valores de degradação considerados muito altos (diâmetro > 25,0 mm) e, dentro destes, podemos destacar os isolados *B. subtilis* T11, T28 e T45, cujos tamanhos dos halos de hidrolise foram, respectivamente, de 31,0 mm, 34,0 mm e 42,0 mm (Figura 18).

O amido, a inulina e a amilopectina, além de alguns outros tipos de substratos são conhecidos por serem bons indutores da atividade amilolítica em microrganismos (MOHANAN; SATYANARAYANA, 2018), além dos resíduos resultantes de processos agroindustriais, que também têm sido muito investigados recentemente (ABD-ELHALEM et al, 2015).

Com relação a produção destas enzimas pelo gênero *Bacillus*, temos o exemplo de *B. amyloliquefaciens* como bons exemplares produtores de amilases industriais (ABD-ELHALEM et al., 2015). Além disso, a espécie *B. tequilensis* também já foi investigada quanto a sua capacidade de produção de enzimas amilolíticas (TIWARI et al., 2014). O amido já foi apontado como uma das melhores fontes de carbono para indução da atividade amilolítica de *Bacillus* (SIMAIR et al., 2017).

Já com relação a estudos feitos sobre a produção enzimática de bactérias de climas semiárido, temos que no trabalho de Gorchach-Lira e Coutinho (2007), 77% das bactérias termofílicas mostraram atividade amilolíticas ao passo de que as bactérias mesofílicas também tiveram resultados similares.

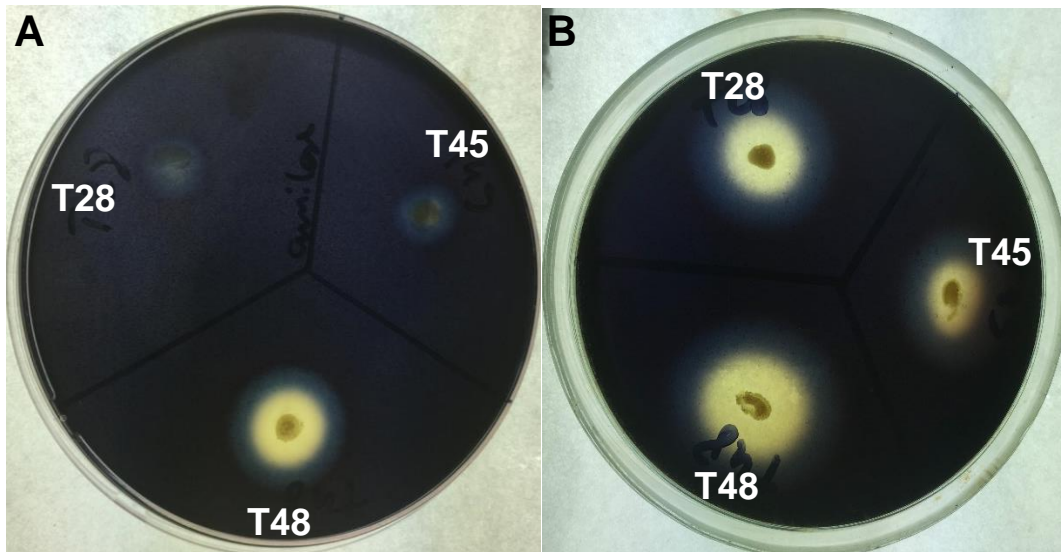


Figura 18. Isolados de bactérias amilolíticas (T28, T45 e T48) em meio de cultura com amido. Fonte: Próprio autor, 2020.

As proteases constituíram o terceiro tipo mais comum produzido pelos isolados deste estudo, de tal forma que 26 dos isolados testados apresentaram resultados positivos para a degradação do meio com gelatina, o que corresponde a aproximadamente 92,85% do total de isolados (Tabela 5, Figura 14). Dentre estes 26, cerca de 12 apresentaram valores de hidrólise considerados muito altos com valores maiores do que 25,0 mm de diâmetro e, com relação a estas bactérias, destacam-se ainda mais os isolados *B. subtilis* T28, T29, T40, T42 e T43, que obtiveram valores de diâmetro de hidrólise do substrato de 30,0 mm, 42,0 mm, 30,0 mm, 30,0 mm e 30,0 mm, respectivamente (Figura 19).

Além do substrato com gelatina, outros substratos têm sido utilizados para a investigação de proteases, tais como a caseína, extrato de soja ou levedura, leite, peptona, entre outros. A exemplo disso, Pant et al. (2015), além de terem purificado uma protease proveniente de *B. subtilis*, também compararam a produção desta enzima com os substratos de gelatina, caseína e leite e concluíram que o meio de cultura com substrato de gelatina foi o com melhores resultados.

Com relação a produção destas enzimas pelo gênero *Bacillus*, temos alguns exemplos tais como *B. stearotheophilus* de solo amazônico como sendo produtores

de proteases colagenolíticas (LIMA et al., 2014b), além de *B. tequilensis* (KHAN et al., 2019), *B. licheniformis* (SILVA, 2011) e *B. firmus* (COSTA, 2005).

Já com relação a estudos feitos sobre a produção enzimática de bactérias de clima semiárido, Martins et al. (2015) investigaram as condições ideais de atividade de proteases de bactérias provenientes de amostras de solo de caatinga do estado do Ceará e concluíram que a maior atividade enzimática se deu a 4°C e em pH ácido, este resultado foi inesperado uma vez que o solo da caatinga pode chegar a uma temperatura de até 60°C então esperava-se que estas enzimas teriam maior eficiência em temperaturas mais elevadas.

Gorlach-Lira e Coutinho (2007) analisaram a produção de proteases por bactérias mesófilas e termófilas da caatinga e em seus resultados foi demonstrado que todos os isolados mesofílicos e termofílicos apresentaram atividade proteolítica, resultados estes que muito próximos dos deste presente trabalho.

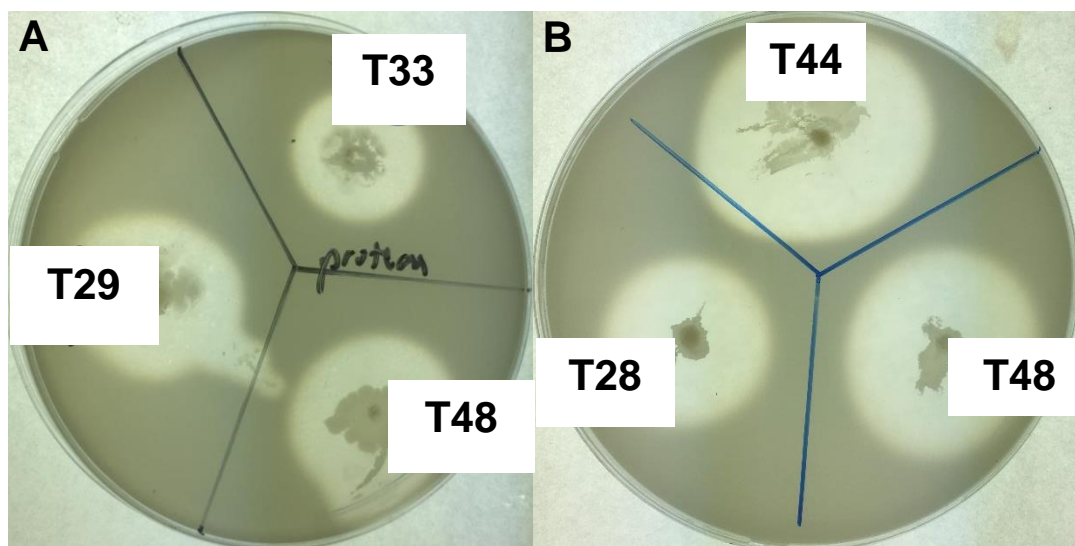


Figura 19. Isolados de bactérias proteolíticas (T28, T29, T33, T44 e T48) em meio de cultura com gelatina. Fonte: Próprio autor, 2020.

Embora há vários relatos na literatura de que actinobactérias, *Bacillus* e *Pseudomonas* conseguem degradar substratos de quitina, no presente trabalho, nenhuma das bactérias testadas demonstrou a capacidade de hidrolisar a quitina. Gorlach-Lira e Coutinho (2007) investigaram a atividade quitinolítica de bactérias

mesofílicas e termofílicas provenientes da caatinga. Como resultado, as actinobactérias mesofílicas foram capazes de produzir quitinases. No entanto, nenhuma das bactérias termofílicas foram capazes de degradar o meio com quitina, assim como os nossos resultados.

5.4. Uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono por bactérias isoladas do solo da caatinga

O uso de açúcares (celobiose, frutose, galactose, lactose, manose, rafinose, xilose e salicilina) e de sais de ácidos orgânicos citrato de sódio e succinato de sódio como fonte de carbono pelas bactérias foram determinadas para 18 isolados dos 28 analisados no trabalho de Grudzinska (2005). Foi observado que 16 dos isolados conseguiram utilizar pelo menos dois dos substratos que foram testados como fonte de carbono para o seu crescimento (Grudzinska, 2005) (Tabela 6, Figura 20).

Com relação somente ao uso de açúcares como fonte de carbono, os únicos que não foram utilizados por nenhuma das bactérias foram os carboidratos galactose, lactose, xilose e salicilina (Grudzinska, 2005). O número de isolados que conseguiram utilizar pelo menos dois destes açúcares no seu metabolismo foi de 12 isolados, com destaque para os isolados *B. subtilis* T10 e T11 e *B. tequilensis* T13 que conseguiram usar 4 dos açúcares testados e tiveram um crescimento considerado como sendo bom (Tabela 6, Figura 20).

Dentre os açúcares que foram testados e que conseguiram ser utilizados pelas bactérias, o carboidrato com os melhores resultados foi a frutose, da qual 14 dos isolados (77,77%) conseguiram utilizar desta fonte de carbono, enquanto que aquele substrato que menos bactérias conseguiram utilizar foi a rafinose, onde apenas 5 dos isolados bacterianos (27,77%) conseguiram utilizá-la. Com relação aos outros dois açúcares com resultados positivos, 11 dos isolados conseguiram utilizar a celobiose enquanto que 12 dos isolados conseguiram fazer uso do carboidrato manose como uma fonte de carbono para o seu crescimento (Tabela 6, Figura 20).

Tabela 6. Capacidade de uso de açúcares e sais orgânicos como fonte de carbono por bactérias do solo da caatinga.

Isolado	Açúcares							Sais Orgânicos		
	Cel	Fru	Gal	Lac	Man	Raf	Xil	Sal	Citrato	Succinato
T1	++	++	-	-	+	-	-	-	+	+
T4	++	+	-	-	+	-	-	-	+	+
T5	++	++	-	-	+	-	-	-	+	+
T7	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
T10	++	++	-	-	++	+	-	-	+	+
T11	++	++	-	-	++	+	-	-	+	+
T12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T13	++	++	-	-	++	+	-	-	+	+
T14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T21	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
T22	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
T25	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
T27	+	++	-	-	++	-	-	-	+	+
T28	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
T29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T31	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+
T33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T35	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+
T39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T42	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T44	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+
T45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND não determinado; - ausência de crescimento; crescimento: fraco (+); moderado (++); muito bom (+++). Açúcares: Cel (celobiose), Fru (frutose), Gal (galactose), Lac (lactose), Man (manose), Raf (rafinose), Xil (xilose), Sal (salicinina). Ácidos orgânicos: Citrato (citrato de sódio), Succinato (succinato de sódio). Fonte: Grudzinska, 2005.

Com relação exclusivamente ao uso de sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono, succinato de sódio e citrato de sódio foram utilizados por 16 dos 18 isolados (88,88%). Únicos isolados que não conseguiram utilizar o citrato de sódio e o

succinato de sódio como fontes de carbono foram os isolados T15 e T43 (Grudzinska, 2005) (Tabela 6, Figura 20).

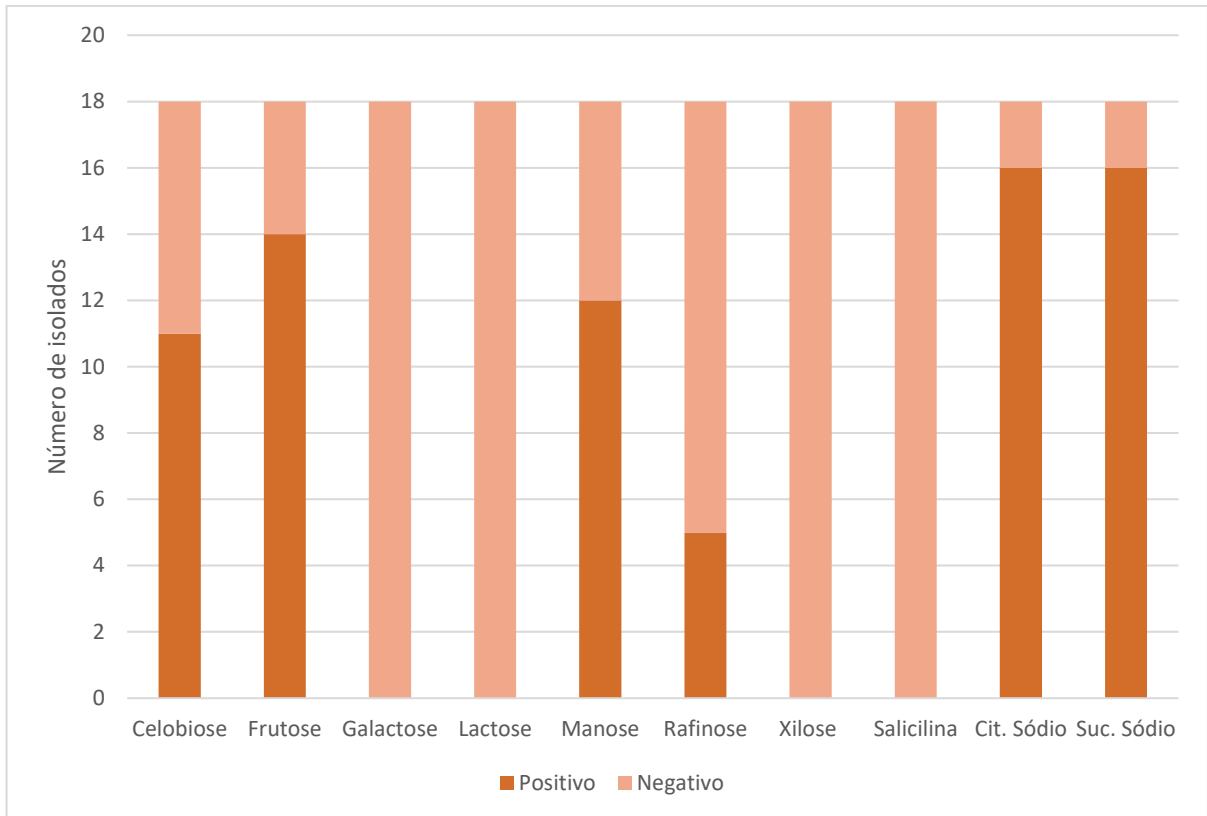


Figura 20. Número de isolados positivos e negativos em teste de uso de açúcares e ácidos orgânicos como fonte de carbono. Fonte: Próprio autor, 2020; Grudzinska, 2005.

As bactérias que podem degradar diversas fontes de carbono diferentes, como foi observado (sejam estas fontes polissacarídeos complexos como a celulase ou o amido ou então açúcares mais simples como a celobiose ou a rafinose), possuem uma vantagem seletiva em ambientes edáficos, especialmente em ambientes tais como a caatinga, uma vez que os solos deste bioma são de característica oligotrófica. Assim, tais organismos estariam como consequência mais adaptados a este ambiente pois esta capacidade pode ser vista como uma forma de evitar a morte celular devido à falta de nutrientes necessários à vida.

6. CONCLUSÕES

1. Todos os isolados pertenceram ao gênero *Bacillus* do filo *Firmicutes*, sendo que 25 isolados apresentaram similaridade com a espécie *B. subtilis* e 3 com a espécie *B. tequilensis*.
2. De acordo com a faixa de temperatura de crescimento, 25 isolados foram classificados como termotolerantes e 3 como termofílicos, com a temperatura ótima de crescimento entre 45°C e 50°C.
3. Todos os isolados testados apresentaram a capacidade de produção de pelo menos de dois tipos de enzimas extracelulares diferentes. Os isolados *B. subtilis* T14, T17, T28 e T45 produziram todas as enzimas analisadas (celulases, amilases, proteases, pectinases, lipases), com exceção de quitinases.
4. O isolado *B. subtilis* T28 se destacou na produção de amilase e protease e o *B. subtilis* T45 na produção de amilase e pectinase pelos tamanhos dos seus halos de degradação.
5. A maioria dos dezoito isolados testados apresentou a capacidade de utilizar pelo menos dois carboidratos dos oito analisados (celobiose, frutose, galactose, lactose, manose, rafinose, xilose e salicilina) como fonte de carbono, enquanto que todos os isolados, com exceção de dois, conseguiram utilizar succinato de sódio e citrato de sódio.
6. Alguns dos isolados de *B. subtilis* apresentam um potencial para produção de enzimas extracelulares, principalmente amilases, proteases e pectinases, com base nos tamanhos dos seus halos de degradação, à exemplo dos isolados T28 e T45.

REFERÊNCIAS

ABD-ELHALEM, B.T; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2015.

AGUILAR, J.G.S.; SATO, H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2017.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. Bioenergética e química celular. *In*: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Biologia molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 43-108.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p.403-410, out. 1990. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

ALTSCHUL, S. F; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p.3389-3402, 16 jul. 1997.

ALVES, J. J. A. Geoecologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. **CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem**, Rio Claro, v. 2, n. 1, p. 58-71, 2007.

ALZOHAIKY, A. M. BioEdit: An important software for molecular biology. **Gerf Bulletin of Biosciences**, v. 2, p. 60-61, 02 jun. 2011.

ANDRADE, L. A.; PEREIRA, I. M.; LEITE, U. T.; BARBOSA, M. R. V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias da caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Cerne**, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2005.

ANDRADE, L. A.; REIS, M. G.; REIS, G. G. Classificação ecológica do estado da Paraíba: Interpolação de dados climáticos por aproximação numérica. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 23-32, 1999.

ASH, C.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 202-206, 1991.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 396-402, 2000. doi:10.1038/sj.jim.7000010.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATO, H. N. Microbial cellulases – diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197-210, 2016.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G.; KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. **Journal of King Saud University – Science**, p. 1-4, 2018.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMES, R. J. H. C.; PILÓN, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyvomyces maxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 24, 137-152, 2000.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. *In*: BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. (Ed.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p. 1-46.

BUNT, J. S.; ROVIRA, A. D. Microbiological studies of some sub Antarctic soils. **Journal of Soil Science**, v. 6, n. 1, p. 119-128, 1955. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.1955.tb00836.x>.

BURNS, R. G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 14. P. 423-427, 1982.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **Bmc**

Bioinformatics, v. 10, n. 1, p. 421-430, 2009. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDELLO L.; GATTÁS, E. A. L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus* sp. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Introdução à microbiologia do solo. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. cap. 1. p. 9-22.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. O solo como um ambiente para a vida microbiana. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. cap. 2. p. 23-36.

CHAMBOST, J. P. Cellulolytic activities of phytopathogenic microorganisms. **Symbiosis**. v. 2, p. 91-101, 1986.

CHEN, J. K., SHEN, C. R., LIU, C. L. N-acetylglucosamine: production and applications. **Marine Drugs**; n. 8, v. 9, p. 2493-516, 2010.

CHEW, L.Y.; TOH, G.T.; ISMAIL, A. Application of proteases for the production of bioactive peptides. *In*: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 247-261.

CHILIVERI, S. R., KOTI, S.; LINGA, V. R. Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11-UV37 using solid state fermentation, **SpringerPlus**, v. 5, n. 559, p. 1-17, 2016.

CHILIVERI, S. R.; LINGA, V. R. A novel thermostable, alkaline pectate lyase from *Bacillus tequilensis* SV11 with potential in textile industry. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 264-272, out. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.065>.

CIHAN, A. C.; TEKIN, N.; OZCAN, B.; COKMUS, C. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analysis isolated from geothermal regions of Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 309-324, 2012.

COHN, F. Untersuchungen über Bakterien. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, v. 1, p. 127-224, 1872.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. G.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 321-334, 2017.

COSTA, C. S. **Produção de protease por *Bacillus firmus* via batelada alimentada utilizando-se de perfis constante e exponencial de alimentação**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

COSTA, R. **Diversidade genética de bactérias edáficas em duas áreas de proteção ambiental do semiárido paraibano**. 2018. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2018.

DAHM, H., SZAJDAK, L. W., GOLIŃSKA, P. Soil enzymes. *In*: NARWAL, S. S., SZAJDAK, L., SAMPIETRO, D. A. **Research Methods in Plant Sciences Vol. 1: Soil Allelochemicals**. Houston: Studium press, 2011, p. 115-134.

DREGNE, H. E. Desertification of arid lands. *In*: EL-BAZ, F.; HASSAN, M. H. A. (Coord.). **Physics of Desertification**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 1986. p. 4.

DUAN, C. J.; FENG, J. X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1765-1775, 2010.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791. 1985.

FENG, Y., DUAN, C. J., LIU, L., TANG, J. L., FENG, J. X. Properties of a metagenome-derived beta-glucosidase from the contents of rabbit cecum. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 73, p. 1470-1473, 2009.

FLORÊNCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp***. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

GATSON, J. W. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. **International Journal Of**

Systematic And Evolutionary Microbiology, v. 56, n. 7, p. 1475-1484, 1 jul. 2006. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63946-0>.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 6, p. 54-76, 2010.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable polymers. *In*: CHAMY, R. **Biodegradation - life of science**. IntechOpen, 2013. p. 141-185.

GIBSON, T.; GORDON, R. E. Endospore-forming rods and cocci. *In*: BUCHANAN, R. E.; GIBSON, N. E. (Ed). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1974. p. 529-575.

GORLACH-LIRA, K. População microbiana no solo e na rizosfera de pastagens de trópico semi-árido. João Pessoa, PB, 1999. 58 p. (**Relatório técnico-científico**, CNPq, Processo 300913/96-6).

GORLACH-LIRA, K; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 135–141, 2007.

GRISI, T. C. S. L. **Diversidade de Bacteria e Archaea do solo do cariri paraibano e prospecção de celulasas e xilanasas em clones metagenômicos e isolados bacterianos**. 2011. 213 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

GRUDZINSKA, K. **Caracterização de bactérias *Bacillus* spp. isoladas do solo do semi-árido do Nordeste do Brasil**. (Em polonês). 2005. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia. Universidade Nicolaus Copernicus, Torun, Polônia, 2005.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, n. 38, p. 987-96, 2003. doi:10.1016/S0032-9592(02)00203-0.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, p. 1599-1616, 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 736-781, 2004.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 205-209, 1971.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles - from an industrial point of view. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 18, p. 259-270, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, RJ, 1992.

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

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEK K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 3-12, 1997.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JIANG, C.; MA, G.; LI, S.; HU, T.; CHE, Z.; SHEN, P.; YAN, B.; WU, B. Characterization of a novel beta-glucosidase-like activity from a soil metagenome. **J Microbiol**. v. 47, p. 542–548, 2009.

JUKES, T. H; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. **Mammalian Protein Metabolism**, New York: Academic Press, 1969, p. 21-132.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 307-313, 2003.

KANTH, S. V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, p. 338-347, 2008.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Chitinases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds) **Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017, p. 335–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00015-4>.

KHAN, Z.; SHAFIQUE, M.; NAWAZ, H. R.; JABEEN, N.; NAZ, S. A. *Bacillus tequilensis* ZMS-2: a novel source of alkaline protease with antimicrobial, anti-coagulant, fibrinolytic and dehairing potentials. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 32, v. 4, p. 1913-1918, jul. 2019.

KHANDEPARKER, R.; PARAB, P.; AMBERKAR, U. Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: biochemical characterization and its application in production of xylobiose from agricultural residues. **Food Technology And Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 164-172, 2017. <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4896>.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**. v. 8, n. 7, p. 1988-2012, 2010.

KOSHY, M.; DE, S. Effect of *Bacillus tequilensis* SALBT crude extract with pectinase activity on demucilage of coffee beans and juice clarification. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 1185-1194, 16 out. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201900321>.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KUMAR, C. G. & TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 561-594, 1999.

KUMAR S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549. 2018.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques. In: **Bacterial Systematics**, p. 125-175, 1991.

LIMA, J. V. L.; PINHEIRO, M. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; MARTINS, S. C. S. M., MARTINS, C. M. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 2300–2316, 2014a.

LIMA, L. A.; CRUZ FILHO, R. F.; SANTOS, J. G.; SILVA, W. C. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 403-410, dez. 2014b. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201305074>.

LIMA, S. L. T.; JESUS, M. B.; SOUSA, R. R. R. S.; OKAMOTO, A. K.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. **Revista Química Nova na Escola**. n. 28, p. 47-49, mai. 2008.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 31, p. 53-61, 2004.

LINGAPPA, Y.; LOCKWOOD, J. L. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. **Phytopathology**, v. 52, p. 317-323, 1962.

LINTNER, K.; PESCHARD, O. Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 22, p. 207-218, 2000.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. *In*: BRAHMACHARI, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Londres: Academic Press, 2016. p. 267-298.

LOWE, D. A. Production of enzymes. *In*: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, p. 391-408, 2001.

LUNA, R. G.; LUNA, J. G.; ANDRADE, A. P.; SOUTO, J. S.; GORLACH-LIRA, K. Biomassa e atividade microbianas em áreas de caatinga sob diferentes densidades de caprinos. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 6, n. 12, p. 217-250, 2019. <http://dx.doi.org/10.21438/rbgas.061218>.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 66, p. 506-577, 2002.

MACDONALD, J. M.; TARLING, C. A.; TAYLOR, E. J.; DENNIS, R. J.; MYERS, D. S.; KNAPP, S.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. Chitinase inhibition by chitobiose and chitotriose thiazolines. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 14, p. 2599-2602, 29 mar. 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200906644>.

MADIGAN, T., M., MARTINKO, M., J., BENDER, S., K., BUCKLEY, H., D., STAHL, A., D. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

MARTINS, S. R. O.; ABREU, J. O. SANTOS, D. R.; VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V. Prospecção de bactérias proteolíticas do solo da caatinga como estratégia de uso sustentável em agrossistemas. *In*: **VI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**. 4., 2015, Porto Alegre.

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms, aspects related to nomenclature and classification. **Histochemical Journal**, v. 17, p. 773-785, 1985.

MEDEIROS, B. C.; MEDEIROS, R. M. Climatologia da precipitação no município de São João do Cariri, PB. Período: 1911-2010. *In: Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido*. 1., 2016, Campina Grande, Anais I CONIDIS, v. 1, ISSN 2526-186X.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, 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, 30 set. 2011. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1-20, 2018. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.13003-1.

MOHITE, B.B.; PATIL, S.V. Impact of microbial cellulases on microbial cellulose biotechnology. *In: GUPTA, V. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial cellulase system properties and applications*. 1. ed. Elsevier, 2016. p. 31-40.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard— Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8**. [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, D. L.; NOX, M. M. Enzimas. *In: NELSON, D. L.; NOX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2020. p. 187-240.

NEVES, A. G. D. **Identificação molecular de bactérias edáficas em uma área de preservação no semiárido paraibano**. 2016. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2016.

NIELSEN, P.; RAINEY, F. A.; OUTTRUP, H.; PRIEST, F. G.; FRITZE, D. Comparative 16S rRNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rDNA group within the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 117, p. 61-66, 1994.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCOOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 29, p. 119-131, 1999.

PANG, H.; ZHANG, P.; DUAN, C. J.; MO, X. C.; TANG, J. L.; FENG, J. X. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. **Current Microbiology**. v. 58, p. 404–408, 2009.

PANT, G.; PRAKASH A.; PAVANI, J. V. P.; BERA S.; DEVIRAM, G. V. N. S.; KUMAR, A.; PANCHPURI, M.; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385-392, 2019.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160p.

RANI, S.; JAGTAP, S. Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics. **Journal of Food Science And Technology**, v. 56, n. 1, p. 497-506, 30 nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-018-3482-6>.

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARIA, A.; BISCHOFF, K. M., HUGHES, S. R., CHRISTOPHER, L. P., SANI, R. K. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, 2010.

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

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425. 1987.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.

SHAFEE, T. **Evolvability of a viral protease catalysis, robustness and specificity**. 2013. 194 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Filosofia). University of Cambridge, 2013.

SHARMA, P.; SHARMA, N.; PATHANIA, S.; HANDA, S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369-377, 2017.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S.; YAZDANI, S.S. Diversity of microbial cellulase system. *In*: GUPTA, V. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial cellulase system properties and applications**. 1. ed. Elsevier, 2016. p. 49-64.

SHARP, R. J.; RILEY, P. W.; WHITE, D. Heterotrophic thermophilic Bacilli. *In*: KRISTIANSSONO, J. K. (Ed) **Thermophilic bacteria**. Boca Raton: CRC Press Inc., p.19-50, 1992.

SHUANGQI, T.; ZHENYU, W.; ZILUAN, F.; LILI, Z.; JICHANG, W. Determination methods of cellulase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 37, p. 7122-7125, 2011.

SIMAIR, A. H.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; LASHARI, S.; BHUTTO, M. A.; MANGRIO, G. S.; LU, C. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **Biomedical Research International**, v. 2017, p. 1-9, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9173040>.

SILVA, H. N. L.; LIMA, R. C.; PINOTTI, L. M. Produção de lipases por *Bacillus megaterium*. In: **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica**. 10., 2014, Vassouras – RJ.

SILVA, M. A. **Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis***. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -amylases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. (Eds). **Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 3-24, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00015-4>.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, n. 6, v. 174, p. 1-15, 19 ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes - an overview. In: SINGH, R. S.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; LARROCHEAL, C. **Advances in Enzyme Technology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 1-40.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; APPURAO A. G. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*, **Process Biochemistry**, n. 35, v.3/4, p. 411–17, 1999. doi:10.1016/S0032-9592(99)00089-8.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In: GERHART, P. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington DC, 1994, p. 607-654.

SOARES JR, F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2195-2203, 2012.

SONNLEITNER, B. Biotechnology of thermophilic bacteria - growth, products, and application. **Advances in Biochemical Engineering**, n. 28, p. 69-138, 1983.

SOUZA, R. F.; BARBOSA, M. P.; NETO, C. P. C. T.; CARVALHO, A. P.; LIMA, A. N. Uso de geotecnologias no diagnóstico da degradação das terras do município de São João do Cariri -PB, **Revista Caatinga**, v. 21, n. 1, p. 204-210, jan-mar. 2008.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 347-355, 2003.

STRZELCZYK, E.; GORLACH, K.; RÓZYCKI, H. Chitinolytic and proteolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 9, n. 3, p.268-272, jun. 1990. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00336238>.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 145-71, 2003.

TABARELLI, M.; LEAL, I. R.; SCARANO, F. R.; SILVA, J. M. C. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 25-29, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602018000400009>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 16 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

TARAGANO, V.; SANCHEZ, V. E.; PILOSOFF, A. M. R. Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 233-236, 1997.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, abr. 1982.

THWAITE, J. E.; ATKINS, H. S. *Bacillus*: Anthrax; food poisoning. In: GREENWOOD, D.; BARER, M.; SLACK, R. IRVING, W. **Medical Microbiology**. 8. ed. Elsevier, p. 237-244, 2012.

TIWARI, S.; SHUKLA, N.; MISHRA, P.; GAUR, R. Enhanced production and characterization of a solvent stable amylase from solvent tolerant *Bacillus tequilensis*

RG-01: thermostable and surfactant resistant. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/972763>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE (UFCG). **Temperatura compensada mensal e anual da Paraíba**. Campina Grande. 2006. Disponível em: <<http://www.dca.ufcg.edu.br/clima/tmedpb.htm>>. Acesso em: 18 de fev. de 2020.

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

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, p.32-38, 1997.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 9, p. 113-148, 2000.

VOGET, S.; STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. **Journal of Biotechnology**. v. 126, p. 26-36, 2006.

WANG, J.; NIU, C.; LIU, X; CHEN, X.; LI, Q. Characterization of a New 1,3-1,4- β -glucanase gene from *Bacillus tequilensis* CGX5-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 826–837, 2014.

WANG, L.; YANG, S. Solid state fermentation and its applications. *In*: YANG, S. (Ed) **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**. 1. ed. Elsevier B. V., 2007, p. 465-489.

WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. Green chemistry. **Environmental impact assessment review**, New York, v. 24, p. 775-799, 2004.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 520–526, 2004.

WHITAKER, J. R. Microbial pectinolytic enzymes. *In*: FOGATTY, W. M.; KELLY, C. T. (Eds) **Microbial Enzymes and Biotechnology**. 2. ed. London: Elsevier, 1990, p. 133-176.

WHITE, A. R. Visualisation of cellulases and cellulose degradation. *In*: BROWN JR, R. M. (Ed) **Cellulose and Other Natural Polymer Systems, Biogenesis, Structure and Degradation**, 1. ed., New York: Plenum Press, 1982, p. 489-509.

YANG, J. K.; SHIH, I. L.; TZENG, Y. M.; WANG, S. L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 406-413, 2000.

ZAMBARE, V.P.; BHALLA, A; MUTHUKUMARAPPAN, K., SANI, R. K.; CHRISTOPHER, L. P. Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. **Extremophiles**, v. 15, p. 611-618, 2011.

ZEHRA, M.; SYED, M. N.; SOHAIL, M. Banana Peels: a promising substrate for the coproduction of pectinase and xylanase from *Aspergillus fumigatus* MS16. **Polish Journal of Microbiology**, n. 69, p. 19-26, 28 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.33073/pjm-2020-002>.

ZHANG, G.; LI, S.; XU, Y.; WANG, J.; WANG, F.; XIN, Y.; SHEN, Z.; ZHANG, H.; MA, M.; LIU, H. Production of alkaline pectinase: a case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33. **Bmc Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 12 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-019-0526-6>.

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

ZHANG, Z. SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1/2, p. 203-214, 2000.