



## Atividade das Enzimas Hidrolíticas Extracelulares de Isolados e Estirpes de Rizóbios

**André Suêlto Tavares de Lima<sup>(1)</sup>, Terezinha Ferreira Xavier<sup>(2)</sup>, Newton Perreira Stamford<sup>(3)</sup>, Maria do Carmo Silva Barreto<sup>(4)</sup> & Márcia do Vale Barreto Figueiredo<sup>(4)</sup>**

- (1) Aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900, [andresuelto@ig.com.br](mailto:andresuelto@ig.com.br). (apresentador do trabalho); (2) Aluna de Mestrado do PPGCS da UFRPE, [terfexa@hotmail.com](mailto:terfexa@hotmail.com); (3) Professor Adjunto do Departamento de Agronomia da UFRPE, [newtonps@ipa.br](mailto:newtonps@ipa.br); (4) Bolsista do Instituto Agronômico de Pernambuco [mcsbarreto@gmail.com](mailto:mcsbarreto@gmail.com); (5) Pesquisadora do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA/CARHP), Av. General San Martin, 1371, Bonji, Recife, PE. CEP 50761-000, [marcia@ipa.br](mailto:marcia@ipa.br).

**RESUMO:** A associação rizóbio x leguminosa contribui para enriquecer o solo com nitrogênio por meio da fixação biológica. Entretanto, pouco se conhece a respeito das características bioquímicas destes microrganismos. Nesse contexto, a presente investigação avaliou a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por isolados e/ou estirpes de rizóbios. Foram testados 18 rizóbios quanto as atividades amilolítica, lactolítica, pectinolítica, proteolítica e quitinolítica, em meio YMA modificado. Em relação as atividades enzimáticas, os isolados 5, 6, 8, 11, 15 e 17 apresentaram atividade lactolítica. O isolado 3 e a estirpe EI 6 apresentaram atividade quitinolítica. Das estirpes testadas a EI 6 foi a única que apresentou atividade proteolítica e foi a estirpe mais eficiente na formação de halo de degradação para as enzimas protease e quitinase.

**Palavras-chave:** amilase, quitinase, pectinase

### INTRODUÇÃO

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, utilizam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas (Pandey et al., 1999). Como exemplo pode-se citar o uso destas enzimas em larga escala nas indústrias têxtil (amilase, celulase, pectinase), papel (lipase, xilanase, oxidoreductase), detergente (celulase, lipase, protease), couro (lipase, protease) e de alimento (pectinase, lipase, amilase, protease), entre outras,

segundo Oliveira et al., (2006). De acordo com algumas estimativas, o uso de enzimas industriais no cenário mundial cresceu de US\$ 1 bilhão em 1995 para US\$ 1,5 bilhão em 2000, podendo atingir uma marca superior a US\$ 2 bilhões em 2008 (Oliveira et al., 2006).

Apesar destas enzimas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (Altamirano et al., 2000).

Excluindo o complexo nitrogenase, pouco se conhece a respeito do perfil enzimático dessas bactérias. Apesar disso, atividades hidrolíticas em estirpes de rizóbio têm recebido alguma atenção, principalmente devido ao possível envolvimento dessas enzimas no processo de infecção radicular de leguminosas. Essa associação simbiótica, além de ser essencial na ecologia global do nitrogênio, é de grande importância econômica na agricultura mundial (Peix et al., 2001).

Nesse sentido, alguns estudos têm detectado atividades pectinolíticas (Hubbell et al., (1978); Jimenez-Zurdo et al., (1996); Saleh-Rastin et al., (1991)) e hemicelulolíticas (López & Signer, (1987); Martinez-Molina, (1979)) em culturas puras de rizóbio. Entretanto, até o momento, pouca atenção tem sido dada à possível capacidade dessas bactérias em produzir outras hidrolases de interesse biotecnológico. Portanto, levando-se em consideração a diversidade microbiológica e a possibilidade de se obterem novas fontes microbianas



de enzimas, o presente estudo objetivou avaliar semi-quantitativamente, em meio de cultura solidificado, as atividades amilolíticas, lactolíticas, pectinolíticas, proteolíticas e quitinolítica de rizóbios.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido, no laboratório de Biologia do Solo – IPA. Foram testados 12 isolados e seis estirpes de rizóbios, quanto às suas capacidades em produzir amilase, lactase, pectinase, protease e quitinase em meios de cultura sólidos. Para detecção das atividades enzimáticas, o período de incubação das bactérias a 28 °C no escuro variou de 24 a 168 h. As enzimas foram testadas em meio YMA modificado, no qual o manitol foi substituído por seus respectivos substratos de carbono. Quando necessário, o pH dos meios foi ajustado para 6,5 - 6,8. A capacidade dos isolados e estirpes de rizóbio em produzir amilase foi avaliada em meio contendo 1% de amido de milho (Maizena®) como fonte de carbono. Ao final de 96 h de incubação, adicionou-se ao meio 5,0 mL de tintura de iodo. Uma zona amarelada ao redor da colônia, em contraste com o meio azulado, indicou a atividade amilolítica (Buzzini & Martini, 2002). A lactase foi avaliada em meio sólido contendo 1% de lactose como substrato de carbono. Ao final de 168 h de incubação, um halo claro ao redor das colônias amareladas indicou a atividade lactolítica. A pectinase foi testada em meio contendo 1% de pectina cítrica como fonte de carbono. Depois de 96 h de incubação, as placas contendo o meio receberam 5,0 mL de solução de HCl 5N. Um halo claro ao redor das colônias alaranjadas indicou a degradação da pectina (Alves et al., 2002). A atividade proteolítica foi verificada em meio contendo 1% de caseína como fonte de carbono. Após 96 h de incubação, adicionou-se às placas 5,0 mL de uma solução de ácido acético a 5% (Stamford et al., 1998), cujo precipitado torna o ágar mais opaco e acentua as zonas claras ao redor das colônias, caracterizando a hidrólise da caseína. A quitinase foi avaliada em meio sólido contendo 1% de quitina como substrato de carbono. Ao final de 168 h de incubação, um halo creme ao redor das colônias indicou a atividade de degradação da quitina. Os rizóbios, cresceram em placas de Petri com meio YMA (agar manitol extrato de levedura) pH 6,5 segundo Vincent (1970), por 48h a temperatura 29 °C, em seguida foram repicados para frascos Erlenmeyer contendo meio YM (manitol e extrato de

levedura), crescendo sob agitação mecânica pelo mesmo tempo. Posteriormente com o auxílio de uma pipeta de precisão transferiu-se 5µL da suspensão bacteriana para as placas contendo os diferentes meios. Foram estabelecidas três bactérias por placa descartável (com divisórias), gerando três repetições dos ensaios enzimáticos. As análises estatísticas das atividades enzimáticas foram realizadas de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparar as médias dos tratamentos. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a presença do halo de degradação os rizóbios testados foram considerados como produtores de enzimas hidrolíticas extracelulares. De 16 isolados e estirpes testadas todas com exceção das estirpes BR 3267 e 4406 apresentaram formação de halo de degradação para as enzimas amilase e quitinase. Quanto a formação de halo de degradação para lactase e pectinase as estirpes BR 3267 e 4406 e o isolado sete, e acrescentando os isolados 14 e 16 (somente para a enzima lactose) apresentaram resposta negativa. Quanto a formação de halo de degradação para a enzima protease o isolado oito e as estirpes 3267 e 4406, apresentaram resposta negativa (**Tab. 2**).

O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. O processo de seleção de microrganismos considerados produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa dos microrganismos (Ceska, 1971; Lin et al., 1991). Alguns autores (Lealem & Gashe, 1994; Stamford et al., 1998) recomendam um IE = 2,0 para considerar um microrganismo produtor de enzimas em meio sólido. Apesar dos rizóbios apresentarem-se como positivos quanto a degradação de lactase (72%), pectinase e protease (83%) e amilase e quitinase (89%) (**Tab.2**), de acordo com os dados da **Tab.3**, apenas os isolados 5, 6, 8, 11, 15 e 17 apresentaram IE > 2 quanto a atividade lactolítica. O isolado seis apesar de obter a maior média 2,63, apresentou diferença significativa apenas para o



isolado oito. Das estirpes testadas a EI 6, foi o único rizóbio capaz de degradar a enzima protease. A quitinase é uma enzima importante por apresentar capacidade de degradar a parede celular, evitando assim doenças em plantas. Sendo assim o isolado três e estirpe EI 6 obtiveram índices enzimáticos satisfatórios. Nenhum rizóbio atingiu IE para amilase e pectinase. Segundo Jimenez-Zurdo et al, (1996) é possível que, em função da reduzida atividade pectinolítica, sobretudo nos isolados de regiões tropicais, seja mais difícil sua observação em meio sólido, principalmente num período de incubação inferior ao de outros estudos (Hubbell et al., 1978 e Mateos et al., 1992), que variou entre 14 a 21 dias.

## CONCLUSÕES

Em relação as atividades enzimáticas, os isolados (5, 6, 8, 11, 15 e 17) apresentaram atividade lactolítica. O isolado três e a estirpe EI 6 apresentaram atividade quitinolítica. A estirpe EI 6 foi a única que apresentou atividade proteolítica. A estirpe EI 6 foi a mais eficiente na formação de halo de degradação para as enzimas protease e quitinase.

## REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANO, M.M.; BLACKBURN, J.M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A.R. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature**, v.403, n.6.770, p.617-622, 2000.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, n.4, p.225-230, 2002.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol.**, v.93, n.6, p.1020-1025, 2002.
- CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. **Eur. J. Biochem.**, v.22, n.2, p.186-192, 1971.
- HUBBELL, D. H.; MORALES, V. M.; UMALLI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.35, n.1, p.210-213, 1978.
- JIMENEZ-ZURDO, J. I.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 28, n. 7, p. 917-921, 1996.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**, v.77, n.3, p.348-352, 1994.
- LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnol. tech.**, v.5, n.5, p.275-280, 1991.
- LÓPEZ, M.; SIGNER, E. Degradative enzymes in *Rhizobium meliloti*. In: VERMA, D.; BRISSON, N. (Eds.). **Molecular Genetics of Plant-microbe Interactions**. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. 1987. p. 185-187.
- MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, V. M.; HUBBELL, D. H. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.38, n.6, p. 1186-1188, 1979.
- MATEOS, P. F.; JIMENEZ-ZURDO, J. L.; CHEN, J.; SQUARTINI, A. S.; HAACK, S. K.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HUBBELL, D. H.; DAZZO, F. B. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 6, p. 1816-1822, 1992.
- OLIVEIRA, A. L. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.1, p. 204-210, jan.-mar. 2006.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v.77, n.1, p. 149-162, 1999.
- PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BORRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biol. Biochem.**, v.33, n.1, p.103-110, 2001.
- SALEH-RASTIN, N.; PETERSEN, M.; COLEMAN, S.; HUBBELL, D. H. Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*. In: Keister, D.; Gregon, P. (Eds.). **The Rhizosphere and Plant Growth**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991. p.188.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ci. Tecnol. Aliment.**, v.18, n.4, p.382-385, 1998.
- VINCENT, J.M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. IBP Handbook n. 15. Blackwell Scient. Oxford, 140p. 1970.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: Departamento de Matemática e Estatística, 1984, 151p.



**Tabela 1.** Isolados e estirpes de rizóbios utilizados no experimento.

Código de acesso	Isolados/estirpes	Planta hospedeira	Procedência
	2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	11	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	16	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lab de Biologia de Solo – IPA
	EI – 6	<i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp	Lab de Biologia de Solo – IPA
	NFB 494	<i>Leucaena leucocephala</i> L.	Lab. Microbiologia – UFRPE
	NFB 577	<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	Lab. Microbiologia – UFRPE
	NFB 700	<i>Cajanus cajan</i> [L.] Mills	Lab. Microbiologia – UFRPE
	BR 3266	<i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp.	CNPAB Km 47 – Seropédica/RJ
	BR 4406	<i>Enterolobium contortisiquum</i>	CNPAB Km 47 – Seropédica/RJ

**Tabela 2.** Produção de enzimas hidrolíticas por isolados e estirpes de rizóbio em meio sólido.

Isolados/estirpes	Enzimas				
	Amilase	Lactase	Pectinase	Protease	Quitinase
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	-	-	+	+
8	+	+	+	-	+
11	+	+	+	+	+
14	+	-	+	+	+
15	+	+	+	+	+
16	+	-	+	+	+
17	+	+	+	+	+
EI – 6	+	+	+	+	+
NFB 494	+	+	+	+	+
NFB 577	+	+	+	+	+
NFB 700	+	+	+	+	+
BR 3267	-	-	-	-	-
BR 4406	-	-	-	-	-

+ presença do halo de hidrólise, - ausência de halo de hidrólise.

**Tabela 3.** Atividades semiquantitativas de lactase, protease e quitinase produzida por isolados de rizóbio em meio YMA modificado.

Isolados/Estirpes	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Diâmetro do halo da colônia (mm)	IE*
<b>Atividade lactolítica</b>			
5	1,63	0,73	2,23ab**
6	1,73	0,67	2,63a
8	1,87	0,90	2,08b
11	1,53	0,67	2,31ab



**Manejo e conservação do solo e da água  
no contexto das mudanças ambientais**  
10 a 15 de agosto de 2008 - Rio de Janeiro

5

<b>15</b>	1,80	0,77	2,37ab
<b>17</b>	1,60	0,73	2,18ab
<b>CV(%)</b>			8,24
<b>Atividade proteolítica</b>			
<b>EI – 6</b>	0,80	0,4	2,00
<b>Atividade quitinolítica</b>			
<b>3</b>	0,83	0,40	2,08
<b>EI – 6</b>	0,63	0,30	2,11

\* Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

\*\* Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.