

ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES DE ISOLADOS DE RIZÓBIA NATIVOS DA AMAZÔNIA CENTRAL, AMAZONAS, BRASIL¹

Arlem Nascimento de OLIVEIRA^{2,*}, Luiz Antonio de OLIVEIRA³,
Jerusa Souza ANDRADE³, Aloisio Freitas CHAGAS JÚNIOR²

RESUMO

A associação rizóbia x leguminosa contribui para enriquecer o solo com nitrogênio por meio da fixação biológica. Entretanto, pouco se conhece a respeito do perfil enzimático desses microrganismos. Nesse contexto, a presente investigação propõe avaliar a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central. Essa triagem constitui o primeiro passo na seleção de microrganismos nativos que são potencialmente exploráveis como produtores de enzimas. Foram testados 67 isolados nativos de rizóbia para as atividades amilolítica, celulolítica, lactolítica, lipolítica, pectinolítica e proteolítica, em meio YMA modificado. A atividade ureolítica foi detectada em meio ágar-uréia. As bactérias isoladas dos nódulos de feijão caupi mostraram maior capacidade em produzir enzimas do que os isolados bacterianos de soja. De todas as enzimas hidrolíticas avaliadas, apenas a pectinase não foi detectada neste estudo. Amilase (32,8%), protease (28,4%), urease (20,9%) e carboximetilcelulase (9,0%) foram as enzimas mais frequentes produzidas pelos isolados. Neste trabalho, apenas as enzimas amilase e protease variaram significativamente entre os isolados de rizóbia. Os isolados INPA R-926 e INPA R-915 exibiram os maiores índices amilolíticos (IE = 3,1) e proteolíticos (IE = 6,6), respectivamente. Este estudo revelou alguns isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central como fontes promissoras de enzimas de importância industrial para uso biotecnológico.

Palavras-chave: amilase, carboximetilcelulase, lactase, lipase, protease, urease.

SUMMARY

EXTRACELLULAR HYDROLYTIC ENZYMES IN INDIGENOUS STRAINS OF RHIZOBIA IN CENTRAL AMAZONIA, AMAZONAS, BRAZIL. Legumes enrich the soil by contributing nitrogen through symbiotic biological nitrogen fixation by rhizobia bacteria. However, very little is known about the extracellular enzymatic profile of these microorganisms. In this context, the production of extracellular hydrolytic enzymes by indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia was evaluated. This screening constitutes the first step in selecting indigenous microorganisms that are potentially exploitable as enzyme producers. Indigenous strains of rhizobia were screened for extracellular amylolytic, carboxymethylcellulolytic, lactolytic, lipolytic, pectinolytic and proteolytic activities on modified YMA. Ureolytic activity was detected on a urea-agar slant. Rhizobia strains isolated from cowpea nodules produced more enzymes than those isolated from soybean nodules. Out of all the extracellular hydrolytic enzymes evaluated, only pectinase was not detected in this study. The most frequent rhizobia enzymes were amylase (32.8%), protease (28.4%), urease (20.9%) and carboxymethylcellulase (9.0%). In this study, only amylase and protease enzymes varied significantly among rhizobia strains. INPA strains R-926 and R-915 showed the highest enzymatic levels for amylase (EI = 3.1) and protease (EI = 6.6), respectively. This paper showed some indigenous strains of rhizobia from Central Amazonia as promising sources of industrially relevant enzymes for biotechnological purposes.

Keywords: amylase, carboxymethylcellulase, lactase, lipase, protease, urease.

1 - 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 [38].

Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase,

celulase, pectinase, oxidorreductase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorreductase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase), de papel (lipase, oxidorreductase, xilanase), e de couro (lipase, protease) [20, 36].

Devido à sua vasta aplicação nesses setores industriais, assim como no campo farmacêutico [41], as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases. Por outro lado, as amilases e celulasas, comumente utilizadas nas indústrias de amido, têxtil e detergente, representam o segundo maior grupo de enzimas [13]. Segundo HARTZELL & HSIEH [15] e TZANOV *et al.* [52], as celulasas, lipases, pectinases e proteases podem ser utilizadas eficientemente nos processos de limpeza de fibras de algodão.

As lactases são amplamente usadas na manufatura de produtos alimentícios tais como leites fermentados, sorvetes, além de outras bebidas lácticas, caso do leite com reduzido teor de lactose, destinado às pessoas intolerantes a esse açúcar [49]. As ureases são comumente observadas em ambientes terrestres e aquáticos, nos quais desempenham

¹Recebido para publicação em 3/3/2006. Aceito para publicação em 20/10/2006 (001684)

²Universidade Federal do Amazonas (UFAM),

E-mail: arllem@yahoo.com.br

³INPA, Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, C. P. 478, CEP 69011-970, Manaus (AM), Brasil,

E-mail: luizoli@inpa.gov.br

* A quem a correspondência deve ser enviada

funções essenciais no metabolismo do nitrogênio. Por exemplo, os processos de degradação protéica e substituição de nucleotídeos requerem atividade ureolítica. Na agricultura, o uso de uréia como fertilizante exige o controle da urease no solo para aumentar sua eficiência e minimizar as perdas de nitrogênio [32].

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas [25]. Apesar disso, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais [2].

Rizóbia são bactérias simbiotes que formam nódulos nas raízes de leguminosas. No interior dos nódulos e na presença de ATP, o complexo nitrogenase reduz o nitrogênio atmosférico em amônia que é utilizada pelas plantas. Essa associação simbiótica, além de ser essencial na ecologia global do nitrogênio, é de grande importância econômica na agricultura mundial [39].

Excluindo o complexo nitrogenase, pouco se conhece a respeito do perfil enzimático dessas bactérias. Apesar disso, atividades hidrolíticas em estirpes de rizóbia têm recebido alguma atenção, principalmente devido ao possível envolvimento dessas enzimas no processo de infecção radicular de leguminosas. Nesse sentido, alguns estudos têm detectado atividades pectinolíticas [17, 19, 42], celulolíticas [19, 26, 33, 42] e hemicelulolíticas [24, 26] em culturas puras de rizóbia. 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 da região e a possibilidade de se obterem novas fontes microbianas de enzimas, o presente estudo objetivou avaliar semiquantitativamente, em meio de cultura solidificado, as atividades amilolíticas, celulolíticas, lactolíticas, lipolíticas, pectinolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios nativos da Amazônia Central.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Coleta dos solos-inóculos

Amostras dos solos foram obtidas em propriedades rurais dos Municípios de Careiro da Várzea e Manacapuru, ambos no Estado do Amazonas. Nessas localidades, foram coletadas amostras de solos de Várzea e de Terra Preta de Índio como fontes potenciais de inóculo de rizóbia. Do ponto

de vista químico, esses dois tipos de solos são considerados férteis. As coletas dos solos foram feitas a partir da rizosfera de plantas de feijão, mandioca, couve, jerimum, pepino, quibo e gramíneas, a uma profundidade máxima de 10 cm.

2.2 - Cultivo das plantas-armadilhas

Para captura dos rizóbios, as amostras de solo-inóculo foram diluídas em 1/30 com areia previamente esterilizada (lavada e autoclavada a 121 °C por 60 min). Foram usadas plantas de feijão caupi e soja como armadilhas, com três repetições para cada amostra de solo. As sementes dessas leguminosas foram previamente desinfestadas com álcool a 95% e solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos e, posteriormente, semeadas em copos plásticos (700 mL). Em casa de vegetação, as plantas-armadilhas foram irrigadas diariamente com água esterilizada e nutridas a cada dois dias com 50 mL de solução nutritiva [37], contendo em mg L⁻¹ de água estéril: Ca (NO₃)₂, 29; CaSO₄.2H₂O, 150; MgSO₄.7H₂O, 125; K₂HPO₄.3H₂O, 100; FeEDTA, 6,3; KCl, 1,36; H₃BO₃, 1,26; MnSO₄.H₂O, 0,626; ZnSO₄.7H₂O, 0,136; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0,136; CuSO₄.5H₂O, 0,125; pH 6,5. Ao final de 45 dias do início da germinação, os nódulos radiculares foram coletados, lavados e armazenados em geladeira (4 °C por 24 h) antes da etapa de isolamento das bactérias.

2.3 - Isolamento dos rizóbios e condições de cultivo

Primeiramente, os nódulos foram lavados com etanol a 95% por dez segundos, imersos em hipoclorito de sódio a 1% por quatro min e lavados oito vezes com água estéril. Em seguida, foram esmagados, com o auxílio de uma pinça, em água estéril e a suspensão de bactérias riscada no meio YMA [55]. Após o processo de riscagem, incubaram-se as placas a 28 °C no escuro até o surgimento de colônias crescidas e isoladas. Com o auxílio de uma alça de platina, a massa de bactérias formada sobre o meio foi novamente riscada no mesmo meio de cultura, visando obtenção de colônias puras. Depois dessa etapa, os isolados foram codificados como diferentes isolados de rizóbia. Até a execução dos testes enzimáticos, as bactérias foram conservadas em meio YMA a 28 °C no escuro.

2.4 - Meios de cultura e atividade enzimática extracelular

Os isolados de rizóbia foram testados quanto às suas capacidades em produzir amilase, carboximetilcelulase, lactase, lipase, pectinase, protease e urease em meios de cultura sólidos. Para isso, colônias puras dos diferentes isolados foram repicadas no centro de placas de Petri, contendo o respectivo meio. Para detecção das atividades enzimáticas, o período de incubação das bactérias a 28 °C no escuro variou de 24 a 336 h. Com exceção da urease, as demais 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. Foram utilizadas três placas para cada meio de cultura, como repetições dos ensaios enzimáticos.

2.4.1 - Amilase

A capacidade dos isolados de rizóbia 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 [5].

2.4.2 - Carboximetilcelulase

A produção de carboximetilcelulase foi detectada em meio contendo 1% de carboximetilcelulose como fonte de carbono. Após 168 h de incubação, a capacidade carboximetilcelulolítica foi constatada por meio da técnica de coloração com vermelho Congo [50], que por interagir com uma ampla variação de polissacarídeos, facilita a visualização do halo de degradação.

2.4.3 - Lactase

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 indicou a atividade lactolítica.

2.4.4 - Lipase

Para a avaliação da enzima lipase, utilizou-se 0,001% de Rodamina B acrescido de 1% de azeite de oliva ao meio como fonte de carbono. Após 336 h de incubação, as placas foram resfriadas a 4 °C por dois dias. A atividade lipolítica das bactérias foi notada como um precipitado na forma de cristais de sais de cálcio ou como um halo transparente desse precipitado em volta das colônias [47]. Quando o halo de degradação não foi visualizado, as placas foram irradiadas com luz ultravioleta (359 nm), em que a fluorescência ao redor das colônias caracterizou a hidrólise da fonte de carbono.

2.4.5 - Pectinase

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 5 N. Um halo claro ao redor das colônias indicou a degradação da pectina [2].

2.4.6 - Protease

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% [47], cujo precipitado torna o ágar mais opaco e acentua as zonas claras ao redor das colônias, caracterizando a hidrólise da caseína.

2.4.7 - Urease

A hidrólise da uréia como fonte de nitrogênio foi avaliada no seguinte meio sólido (g L⁻¹ de água estéril): glicose, 20; uréia, 1,3; MgSO₄·7H₂O, 0,5; CaCl₂, 0,3; ágar, 15 e vermelho fenol, 0,12, pH 6,8 [11]. Nesse meio, a urease foi observada adicionando-se 3,0 mL de sobrenadante enzimático (centrifugado a 12000 rpm por dez minutos) proveniente de cada um dos isolados em tubos de ensaio com o meio ágar-uréia. Após o tempo de reação de 24 h, a mudança do indicador ácido-base de amarelo-alaranjado (pH 6,8) para rosa [29] indicou resultado positivo. Uma vez notada a atividade urease, recuperou-se parte do sobrenadante que reagiu com o meio para medir seu pH. Nesse teste, o sobrenadante foi obtido após três dias de crescimento das bactérias em meio YM [55] modificado, substituindo-se o manitol por maltose.

2.5 - Índice enzimático

A atividade hidrolítica das bactérias foi estimada semiquantitativamente usando-se um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia [14]. Desta forma, os isolados de rizóbia que exibirem os maiores IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular.

2.6 - Análises estatísticas

As análises estatísticas das atividades enzimáticas foram realizadas de acordo com um delineamento experimental completamente 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 ESTAT, pacote estatístico desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas UNESP-Jaboticabal (1992) [8].

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 67 isolados testados (46 isolados dos nódulos do caupi e 21 isolados da soja), 22 revelaram atividade amilolítica (32,8%); 19, proteolítica (28,4%); seis, carboximetilcelulolítica (9,0%); quatro, lactolítica (6,0%); três, lipolítica (4,5%); e 14 isolados exibiram atividade ureolítica (20,9%). Porém, não se observou a produção de pectinase em nenhum dos isolados de rizóbia testados (Tabela 1). Esse registro contraria relatos da ocorrência de pectinases em algumas estirpes de rizóbia [17, 19, 28, 40]. HUBBELL *et al.* [17] e MATEOS *et al.* [28] observaram grande variação na atividade de pectinases em isolados de *Rhizobium trifolii* e *R. phaseoli*. No mesmo estudo, HUBBELL *et al.* [17] também verificaram baixos níveis ou ausência de atividade em onze estirpes tropicais de *Rhizobium* sp.

É possível que, em função da reduzida atividade pectinolítica, sobretudo nos isolados de regiões tropicais, seja mais difícil sua observação em meio sólido [19], principalmente num período de incubação inferior ao de outros estudos [17, 28], que variou de 14 a 21 dias.

Mais de 73% dos isolados obtidos dos nódulos do caupi exibiram atividades amilolítica, proteolítica, lactolítica, celulolítica e lipolítica. Nenhuma das bactérias isoladas dos nódulos da soja mostrou atividade lipolítica em meio YMA modificado. Quanto à atividade ureolítica, mais de 64% das bactérias isoladas do caupi demonstraram habilidade em degradar uréia (*Tabela 1*). Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas do caupi possuem um complexo enzimático mais diverso em relação aos isolados bacterianos de soja. Das sete enzimas avaliadas, os isolados INPA R-926 e INPA R-988 exibiram atividades hidrolíticas para quatro. Dessas, amilase, protease e urease foram comuns aos dois isolados. Por sua vez, o isolado INPA R-991 apresentou atividades amilolítica, celulolítica, lactolítica, proteolítica e ureolítica (*Tabela 1*). Porém, vale salientar, que dos 67 isolados testados, 32 não revelaram atividade para nenhuma das enzimas avaliadas (dados não mostrados).

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 [6, 22]. Alguns autores [21, 47] recomendam um IE $\geq 2,0$ para considerar um microrganismo produtor de enzimas em meio sólido. De acordo com os dados da *Tabela 2*, as maiores atividades amilolíticas (IE $\geq 2,7$) foram apresentadas pelos isolados de rizóbia INPA R-926, INPA R-988 e INPA R-957. Os isolados INPA R-991, INPA R-915, INPA R-987, INPA R-975 e INPA R-994 foram também bons produtores de amilase, pois exibiram IE $\geq 2,0$.

Conforme ALLISON [1], o suprimento de carboidrato é um dos principais fatores envolvidos na formação e desenvolvimento de nódulos em leguminosas. Em plantas de feijão e soja, alguns trabalhos têm detectado acúmulo de trealose, maltose e sacarose nos nódulos radiculares [34, 48]. Atividades enzimáticas para esses dissacarídeos também têm sido detectadas nos nódulos [10, 43], com os seus compartimentos contendo numerosas atividades de glicosidases [4, 30].

Alguns estudos têm chamado a atenção para a importância do amido no processo de nodulação. ARDOUREL

TABELA 1 – Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de rizóbia em meio sólido.

Isolados	Amilase	Carboximetil celulase	Lactase	Lipase	Pectinase	Protease	Urease
INPA R-901*	-	-	-	-	-	+	-
INPA R-902*	+	-	-	-	-	-	-
INPA R-908*	+	+	-	-	-	-	+
INPA R-911*	+	-	-	-	-	+	+
INPA R-915*	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-921*	+	-	-	-	-	-	+
INPA R-922*	+	+	-	-	-	-	-
INPA R-923*	+	-	-	-	-	-	-
INPA R-926*	+	-	-	+	-	+	+
INPA R-927*	+	-	-	-	-	-	-
INPA R-936*	-	-	+	-	-	-	-
INPA R-937*	+	-	-	-	-	-	-
INPA R-957*	+	-	-	-	-	+	+
INPA R-968*	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-971*	-	-	-	-	-	+	-
INPA R-972A*	-	+	+	-	-	+	-
INPA R-972B*	-	-	-	-	-	+	-
INPA R-973*	+	-	-	+	-	-	-
INPA R-975*	+	-	-	+	-	-	+
INPA R-979*	-	+	-	-	-	-	-
INPA R-986*	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-987*	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-988*	+	-	+	-	-	+	+
INPA R-989*	-	-	-	-	-	+	+
INPA R-990*	+	+	-	-	-	-	-
INPA R-4A**	-	-	-	-	-	-	+
INPA R-4B**	-	-	-	-	-	-	+
INPA R-16**	-	-	-	-	-	-	+
INPA R-991**	+	+	+	-	-	+	+
INPA R-993A**	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-993B**	-	-	-	-	-	+	+
INPA R-994**	+	-	-	-	-	+	-
INPA R-995**	+	-	-	-	-	+	-

+ = resultado positivo: presença do halo de hidrólise; - = resultado negativo: ausência de halo; e * e ** = bactérias isoladas de feijão caupi e soja, respectivamente.

TABELA 2 – Atividades semiquantitativas de amilase produzida por isolados de rizóbia em meio YMA modificado¹.

Isolados	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Diâmetro do halo da colônia (mm)	IE ²
INPA R-926	21,4	7,0	3,1 a
INPA R-988	18,8	6,6	2,8 ab
INPA R-957	17,9	6,5	2,7 ab
INPA R-991	16,3	6,8	2,4 bc
INPA R-915	13,7	6,1	2,2 bcd
INPA R-987	7,4	3,6	2,1 cd
INPA R-975	12,8	6,2	2,1 cd
INPA R-994	11,1	5,6	2,0 cde
INPA R-922	10,5	6,0	1,8 de
INPA R-993A	12,5	7,2	1,7 def
INPA R-921	9,4	6,2	1,5 defg
INPA R-995	7,5	5,0	1,5 defg
INPA R-973	8,4	6,0	1,4 efgh
INPA R-986	9,5	6,8	1,4 efgh
INPA R-927	9,6	6,8	1,4 efgh
INPA R-990	9,3	7,3	1,3 fgh
INPA R-908	8,5	6,7	1,3 fgh
INPA R-968	9,5	7,1	1,3 fgh
INPA R-937	9,1	6,8	1,3 fgh
INPA R-902	8,1	6,9	1,2 gh
INPA R-923	7,2	6,5	1,1 gh
INPA R-911	6,5	5,8	1,1 gh

¹Médias de três repetições; Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,01$); DMS (Tukey) = 0,48; e ²Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

et al. [3] registraram acúmulo de amiloplastos em nódulos e em células corticais de alfafa nodulada por *Rhizobium meliloti*. O estudo revelou, ainda, que um mutante de *R. meliloti* (*nodF/nodL*), incapaz de penetrar um hospedeiro normal, acumulou grandes quantidades de grãos de amido. Resultado semelhante foi registrado em nódulos de soja por MÜLLER *et al.* [34], com um mutante não nodulífero de *Bradyrhizobium japonicum*. Muitos autores sugerem uma possível participação das glicosidases (amilases, celulase, lactase, maltase, pectinase e trealase) no estabelecimento da simbiose rizóbia x leguminosa [4, 12, 45, 54]. Portanto, esses relatos corroboram os resultados encontrados nesse trabalho.

Os IE carboximetilcelulolíticos variaram de 1,5 a 2,0 sem resultar em diferença significativa ($p < 0,01$) entre os isolados de rizóbia. Neste estudo, o isolado INPA R-922 mostrou IE no limite mínimo para ser considerado produtor de carboximetilcelulase em meio sólido (Tabela 3).

A atividade carboximetilcelulolítica, registrada neste trabalho, confirma os resultados de MARTÍNEZ-MOLINA *et al.* [26], MATEOS *et al.* [28] e SALEH-RASTIN *et al.* [42], que detectaram em diversas estirpes nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. HU & LIN [16] e JIMENÉZ-ZURDO *et al.* [19] que detectaram atividade carboximetilcelulolítica *Sinorhizobium fredii* RO CCRC 15769 e *Bradyrhizobium japonicum* ATCC 10324, respectivamente. Vale salientar que nestes estudos a atividade celulolítica foi a intracelular, ou seja, obtida a partir de extratos sonificados de células. CHEN *et al.* [7], além de confirmarem a atividade carboxi-

TABELA 3 – Atividades semiquantitativas de carboximetilcelulase, lactase e lipase produzidas por isolados de rizóbia em meio YMA modificado¹.

Isolados	Diâmetro do halo de degradação (mm)	IE ²
Atividade carboximetilcelulolítica		
INPA R-922	5,3	2,0
INPA R-972A	6,3	1,9
INPA R-908	5,0	1,7
INPA R-979	6,5	1,6
INPA R-990	6,1	1,5
INPA R-991	4,3	1,5
Atividade lactolítica		
INPA R-972A	13,1	2,0
INPA R-988	20,3	1,7
INPA R-936	9,4	1,7
INPA R-991	16,1	1,6
Atividade lipolítica		
INPA R-973	8,2	1,3
INPA R-975	7,4	1,1
INPA R-926	7,4	1,1

¹Médias de três repetições; DMS (Tukey) = 1,02 (carboximetilcelulase), DMS (Tukey) = 0,34 (lipase), DMS (Tukey) = 0,68 (lactase); e ²Os valores dos índices enzimáticos representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

metilcelulolítica em *S. fredii* RO CCRC 15769, purificaram e caracterizaram essa hidrolase. Neste estudo, os autores registraram temperatura e pH ótimos de 35 °C e 7,0, respectivamente. Embora os dados deste estudo não sustentem comparações mais aprofundadas, vale mencionar que estes parâmetros cinéticos estão próximos da temperatura (33 °C) e pH do solo (6,5) de onde as bactérias estudadas foram isoladas.

Os resultados observados para a atividade lactolítica mostraram que apenas o INPA R-972A pode ser considerado lactolítico, apesar de não diferir estatisticamente ($p < 0,01$) dos outros isolados (Tabela 3). Poucos estudos reportam atividade lactolítica em isolados de rizóbia. NIEL *et al.* [35] registraram a atividade de duas lactases em *Rhizobium meliloti*, atualmente *Sinorhizobium meliloti*. UCKER & SIGNER [53] demonstraram que *S. meliloti* 2011 contém uma lactase e que sua atividade pode ser induzida em nove vezes na presença de lactose. GLENN & DILWORTH [12] registraram a atividade lactolítica em 45 isolados de rizóbia. Outros reportaram a clonagem e a caracterização de genes codificando a lactase de *S. meliloti* 2011 [9]. MARTÍNEZ *et al.* [27] e YEOMAN *et al.* [56] também registram atividade lactolítica em várias estirpes de *R. leguminosarum*. Esses trabalhos sustentam a capacidade lactolítica exibida por alguns isolados avaliados neste estudo.

A atividade enzimática lipolítica foi inferior a 2,0, portanto, os isolados não devem ser consideradas produtoras de enzima lipase nas condições experimentais estudadas (Tabela 3).

Os resultados da seleção dos isolados de rizóbia quanto à atividade proteolítica são apresentados na Tabela 4. Os IE variaram entre 1,3 e 6,6, causando diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as bactérias estudadas. Dentre elas, o isolado

INPA R-915 exibiu o maior IE, sendo esse valor três vezes maior do que o mínimo sugerido ($IE \geq 2,0$) para reputá-lo como proteolítico em meio sólido [21, 47]. Por apresentarem $IE \geq 2,4$, as bactérias INPA R-972B, INPA R-987, INPA R-972A, INPA R-986, INPA R-971 e INPA R-993A também podem ser consideradas boas fontes de protease (Tabela 4). Estes resultados ratificam relatos de produção dessa hidrolase por algumas estirpes de *Rhizobium* [12, 26].

TABELA 4 – Atividade proteolítica extracelular em meio sólido dos isolados de rizóbia¹.

Isolados	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Diâmetro do halo da colônia (mm)	IE ²
INPA R-915	41,6	6,4	6,6 a
INPA R-972B	30,2	6,8	4,4 b
INPA R-987	31,0	9,0	3,5 bc
INPA R-972A	20,2	7,0	2,9 bc
INPA R-986	18,4	6,7	2,8 bc
INPA R-971	17,7	7,4	2,4 bc
INPA R-993A	24,0	10,1	2,4 bc
INPA R-994	11,4	5,5	2,1 c
INPA R-991	18,1	9,0	2,0 c
INPA R-993B	12,6	7,2	1,8 c
INPA R-988	12,7	7,3	1,7 c
INPA R-957	13,7	8,1	1,7 c
INPA R-911	10,6	6,6	1,6 c
INPA R-968	10,9	6,9	1,6 c
INPA R-989	11,9	8,1	1,5 c
INPA R-926	13,0	7,9	1,5 c
INPA R-995	7,6	5,0	1,5 c
INPA R-901	12,6	9,4	1,4 c
INPA R-965	9,0	6,9	1,3 c

¹Médias de três repetições; Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,01$); DMS (Tukey) = 2,20; e ² Os valores dos índices enzimáticos representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

A atividade ureolítica é uma variável dependente do pH de alcalinização do meio de cultura, ou seja, quanto mais alto o pH, maior é a atividade de urease. Analisando o sobrenadante enzimático das bactérias positivas, observou-se que os valores de pH variaram de 7,8 a 8,7 (dados não mostrados). Neste trabalho, os isolados INPA R-988, INPA R-989, INPA R-926, INPA R-975, INPA R-921, INPA R-908, INPA R-4B, INPA R-991 e INPA R-993 apresentaram as maiores atividades. Comparativamente, as atividades ureolíticas das duas primeiras bactérias foram significativamente maiores do que as dos outros isolados (Figura 1).

A enzima urease é freqüente em bactérias do solo. Estudando seis diferentes tipos de solo, LLOYD & SHEAFFE [23] anotaram a atividade ureolítica em 30% dos isolados bacterianos. SANOMIYA & NAHAS [44], investigando a participação de microrganismos produtores de hidrolases nas transformações de compostos de carbono e nitrogênio do solo, registraram a atividade ureolítica em mais de 25% dos isolados.

A capacidade de utilização de uréia como fonte de nitrogênio por estirpes de *Rhizobium leguminosarum* foi documentada pela primeira vez por JENSEN & SCHRÖDER

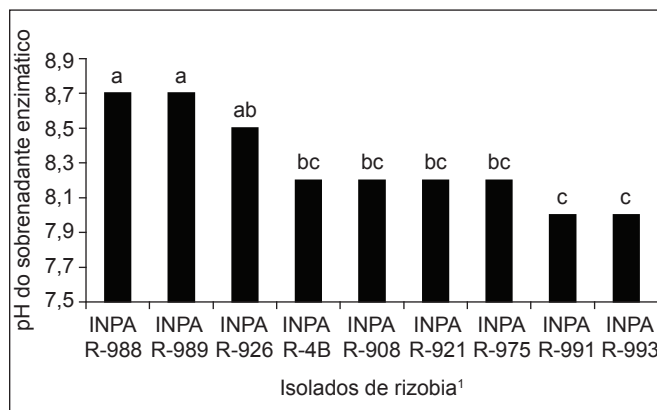


FIGURA 1 – Atividade ureolítica resultante da mudança de pH do indicador vermelho de fenol de amarelo-alaranjado (pH 6,8) para rosa (pH $\geq 7,8$). ¹Médias de três repetições; Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,01$); DMS (Tukey) = 0,35.

[18]. Resultados semelhantes foram observados para *Sinorhizobium meliloti* [31]. Por outro lado, uma grande variabilidade nessa característica pode ocorrer em isolados de *Bradyrhizobium* [18]. SINGH *et al.* [46], além de inscreverem a presença dessa hidrolase em *R. leguminosarum* P-5 bv. *viciae*, discutiram a importância do Ni^{2+} na atividade ureolítica dessa bactéria. Recentemente, um grupo de genes ureolíticos de *R. leguminosarum* UPM 791 bv. *viciae* foi caracterizado [51].

4 - CONCLUSÕES

- As bactérias isoladas dos nódulos de feijão caupi mostraram maior capacidade em produzir enzimas hidrolíticas extracelulares do que os isolados bacterianos de soja;
- Os isolados de rizóbia produziram várias enzimas hidrolíticas, com predomínio de amilase (32,8%) e protease (28,4%), seguidas por urease (20,9%) e carboximetilcelulase (9,0%);
- O isolado INPA R-991 apresentou atividades amilolítica, carboximetilcelulolítica, lactolítica, proteolítica e ureolítica em meio sólido;
- As enzimas amilase, protease e urease foram comuns às bactérias INPA R-926 e INPA R-988;
- As maiores atividades amilolíticas foram exibidas pelos isolados de rizóbia INPA R-926 ($IE = 3,1$), INPA R-988 ($IE = 2,8$) e INPA R-957 ($IE = 2,7$);
- Os isolados INPA R-915 ($IE = 6,6$) e INPA R-972B ($IE = 4,4$) mostraram os maiores índices enzimáticos proteolíticos em meio YMA modificado.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLISON, F. E. Carbohydrate supply as a primary factor in legume symbiosis. **Soil Science**, v. 39, n. 1, p. 123-143, 1935.

- [2] 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.
- [3] ARDOUREL, M.; DEMONT, N.; DEBELLÉ, F.; MAILLET, F.; DE BILLY, F.; PROMÉ, J. C.; DÉNARIÉ, J.; TRUCHET, G. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. **Plant Cell**, v. 6, n. 10, p. 1357-1374, 1994.
- [4] BERTHELOT, K.; DELMOTTE, F. M. Purification and Characterization of an α -Glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) Strain USDA 4280. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 2907-2911, 1999.
- [5] 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.
- [6] CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. **Eur. J. Biochem.**, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971.
- [7] CHEN, P. J.; WEI, T. C.; CHANG, Y. T.; LIN, L. P. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 45, n. 2, p. 111-118, 2004.
- [8] ESTAT 2.0. Sistema de Análise Estatística. Jaboticabal: Polo Computacional - Departamento de Ciências Exatas - UNESP, 1992.
- [9] FANNING S.; O'GARA, F. Cloning and characterization of a novel beta-galactosidase-coding gene from *Rhizobium meliloti*. **Gene**, v. 71, n. 1, p. 57-64, 1988.
- [10] FARÍAS-RODRÍGUEZ, R.; MELLOR, R. B.; ARIAS, C.; PEÑA-CABRIALES, J. J. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. **Physiol. Plant.**, v. 102, n. 3, p. 353-359, 1998.
- [11] GHASEMI, M. F.; BAKHTIARI, M. R.; FALLAHPOUR, M.; NOOHI, A.; MOAZAMI, N.; AMIDI, Z. Screening of Urease Production by *Aspergillus niger* Strains. **Iran. Biomed. J.**, v. 8, n.1, p. 47-50, 2004.
- [12] GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast and slow growing species of *Rhizobium*. **Arch. Microbiol.**, v. 129, n. 3, p. 233-239, 1981.
- [13] GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T. (Ed.). **Industrial Enzymology**. 2nd ed. London, Macmillan Press, 1996. p. 120-138.
- [14] HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- [15] HARTZELL, M. M.; HSIEH, Y. L. Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. **Text. Res. J.**, v. 68, n. 4, p. 233-241, 1998.
- [16] HU, C. Y.; LIN, L. P. Characterization and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC 15769. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 5, p. 515-522, 2003.
- [17] HUBBELL, D. H.; MORALES, V. M.; UMALLI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 210-213, 1978.
- [18] JENSEN, H.; SCHRØEDER, M. Urea and biuret as nitrogen source for *Rhizobium* sp. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 28, n. 1, p. 473-478, 1965.
- [19] 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.
- [20] KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13 n. 4, p. 345-351, 2002.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] LLOYD, A. B.; SHEAFFE, M. J. Urease activity in soils. **Plant Soil**, v. 39, n. 1, p. 71-80, 1973.
- [24] LÓPEZ, M.; SIGNER, E. Degradative enzymes in *Rhizobium meliloti*. In: VERMA, D.; BRISSON, N. (Eds.). **Molecular Genetics of Planta-microbe Interactions**. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. ISBN 90-2473426-6, 1987. p. 185-187.
- [25] MANFIO, G. P.; LEMOS, M. F. Microorganismos e Aplicações Industriais. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/4/gilson.html>. Acesso em: 02 mar. 2003.
- [26] 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.
- [27] MARTÍNEZ, M.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T. Characterization of a new internal promoter (P3) for *Rhizobium leguminosarum* hydrogenase accessory genes *hupGHIJ*. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 665-675, 2004.
- [28] 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.
- [29] MCNULTY, C. A.; WISE, R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. **Lancet**, v. 1, n. 1, p. 1443-1444, 1985.
- [30] MELLOR, R. B. Bacteroids in the *Rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 8, p. 831-839, 1989.
- [31] MIKSCH, G.; EBERHARDT, U. Regulation of urease activity in *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 120, n. 1-2, p. 149-154, 1994.

- [32] MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbiol Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. **Microbiol. Rev.**, v. 53, n. 1, p. 85-108, 1989.
- [33] MORALES, V.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HUBBEL, D. Cellulase production by *Rhizobium*. **Plant Soil**, v. 80, n. 3, p. 407-415, 1984.
- [34] MÜLLER, J.; STAEHELIN, C.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Carbohydrate pools in nodules of “nonnodulating” and “supernodulating” soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Bragg) mutants. **J. Plant Physiol.**, v. 145, n. 2 p. 759-762, 1995.
- [35] NIEL, C.; GUILLAUME, J. B.; BECHET, M. Demonstration of two enzymes with beta-galactosidase activity in *Rhizobium meliloti*. **Can. J. Microbiol.**, v. 23, n. 9, p. 1178-1181, 1977.
- [36] NIELSEN, R. I.; OXENBØLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n.3, p. 69-71, 1998.
- [37] OLIVEIRA, L. A. **Competitive ability of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strains**. Minnesota, 1988. 125p. Thesis (Ph.D. in Soil Microbiology), University of Minnesota, United State of American.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. Analysis of the pectinolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. **J. Plant Physiol.**, v. 120, n. 2, p. 181-187, 1985.
- [41] RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Reviews**, v. 62, n. 3, p. 596-635, 1998.
- [42] 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.
- [43] SALMINEN, S. O.; STREETER, J. C. Enzymes of α , α -trehalose metabolism in soybean nodules. **Plant Physiol.**, v. 81, n. 2, p. 538-541, 1986.
- [44] SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ci. Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.
- [45] SINGH, A. P.; SINGH, J. B. Differences in α and β -glucosidase and β -galactosidase activity among fast and slow-growing species of *Rhizobium* and *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbios**, v. 43, n.1, p. 169-176, 1985.
- [46] SINGH, S.; KAYASTHA, A. M.; ASTHANA, R. K.; SRIVASTAVA, P. K.; SINGH, S. P. Response of *Rhizobium leguminosarum* to nickel stress. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 7, p. 667-772, 2001.
- [47] 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.
- [48] STREETER J. C. Accumulation of α , α -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. **J. Bacteriol.**, v. 164, n. 1, p. 78-84, 1985.
- [49] SWALLOW, D. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Ann. Rev. Genet.**, v. 37, n. 1-2, p. 197-219, 2003.
- [50] TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-poly-saccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.
- [51] TOFFANIN, A.; CADAHIA, E.; RUIZ-ARGÜESO, J. I. T.; Palacios, J. M. Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Arch. Microbiol.**, v. 177, n.4, p. 290-298, 2002.
- [52] TZANOV, T.; CALAFELL, M.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Bio-preparation of cotton fabrics. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 29, n. 6-7, p. 357-362, 2001.
- [53] UCKER, D. S.; SIGNER, E. R. Catabolite-repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v. 136, n. 3, p. 1197-1200, 1978.
- [54] VAN SPRONSEN, P. C.; BAKHUISEN, R.; VAN, BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 64, n.1, p. 88-94, 1994.
- [55] VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodules bacteria**. Brackwell Science Publication, Oxford, 1970. 159 p.
- [56] YEOMAN, K. H.; CURSON, A. R. J.; TODD, J. D.; SAWERS, G.; JOHNSTON, A. W. B. Evidence that the *Rhizobium* regulatory protein RirA binds to *cis*-acting iron-responsive operators (IROs) at promoters of some Fe-regulated genes. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 4065-4074, 2004.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo: 474007/2003-0) - e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (Processo: 624/04) –, pela concessão de recursos financeiros à realização deste trabalho. O primeiro autor mostra-se grato também à Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA –, pela concessão da bolsa de doutorado.