



Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial

Isolation and screening of microorganisms that produce enzymes of commercial interest

B. C. R. Silva¹; I. M. Gois¹; D. F. Bispo¹; J. J. Marques²; C. F. Silva^{1*}

1 Departamento de Engenharia Química/Laboratório de Bioquímica Industrial, Universidade Federal de Sergipe, 49045-790, São Cristóvão-SE, Brasil

2 Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Sergipe, 49045-790, São Cristóvão-SE, Brasil

*ferrazcristina@ufs.br

(Recebido em 12 de abril de 2017; aceito em 25 de janeiro de 2018)

Enzimas são proteínas amplamente utilizadas no âmbito industrial devido a sua alta especificidade de substrato e capacidade catalítica, sendo obtidas preferencialmente a partir de micro-organismos. Para suprimento dessa demanda, há uma crescente busca por novas linhagens de fungos e bactérias produtores potenciais dessas enzimas, levando ao isolamento a partir dos mais diferentes biomas. O manguezal possui uma grande biodiversidade associada às suas áreas. Por conta disso, foi utilizado para o presente trabalho o isolamento de micro-organismos a partir de um manguezal sergipano, avaliando posteriormente a capacidade dos isolados em produzir enzimas como amilases, proteases, celulasas e lipases, que têm destaque nos setores farmacêuticos, de alimentos, têxtil e de bebidas. A produção dessas enzimas foi determinada através de seus índices enzimáticos usando a razão entre o diâmetro da degradação do indutor no meio e o diâmetro de crescimento microbiano. Nesse estudo, foi utilizado o método da difusão radial em meio sólido, onde foi observado que 65,5% das bactérias e 50% dos fungos isolados foram capazes de produzir enzimas amilolíticas, sendo 30% das bactérias consideradas boas produtoras com valores de índice enzimático $\geq 2,0$. Com relação à produção de protease, 76,9 % das bactérias e 50% dos fungos isolados degradaram o meio proteico. No entanto, apenas 10% dos fungos e 69,2% das bactérias isoladas foram consideradas boas produtoras de protease. Os isolados obtidos não apresentaram atividades enzimáticas para celulase e lipase.

Palavras-chave: enzimas, micro-organismo, isolamento

Enzymes are proteins widely used in the industrial field due to their high substrate specificity and catalytic ability, being obtained preferably from microorganisms. To supply this demand, there is a growing search for new strains of potential fungi and bacteria producers of these enzymes, leading to isolation from the most different biomes. The mangrove has a great biodiversity associated to its areas. As a result, the isolation of microorganisms from a Sergipe mangrove was used for this study and, subsequently, the evaluation of the ability of the isolates to produce enzymes such as amylases, proteases, cellulases and lipases, which are prominent in the pharmaceutical, food, textile and beverage industries. The production of these enzymes was determined by their enzymatic index, which is the ratio between the diameter of the degradation of the inducer substance in the medium and the microbial growth one. In this study, it was used the radial diffusion method on solid medium, where it was observed that 65.5% of bacteria and 50% of the fungal isolates were able to produce amylolytic enzymes, with 30% of bacteria considered good enzyme producers with index values ≥ 2.0 . Regarding protease production, 76.9% of bacteria and 50% of the fungal isolates degraded protein means. However, only 10% of fungi and 69.2% of bacteria isolates were found to be good protease producers. The obtained isolates did not present enzymatic activities for cellulase and lipase.

Keywords: enzymes, microorganisms, isolation

1. INTRODUÇÃO

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. As enzimas são obtidas a partir de diferentes fontes vegetais, animais e microbianas. No entanto, a obtenção

de enzimas de origem microbiana é preferível devido à possibilidade de produção por processos fermentativos em grande escala com regularidade e requerimentos nutricionais bastante simples [1]. Dentre as principais enzimas de interesse comercial, podem ser destacadas as amilases, proteases, celulasas e lipases, as quais são amplamente empregadas em vários setores industriais, como na indústria de alimentos, têxtil, de cosméticos, de bebidas, farmacêutica, dentre outras. Devido à ampla utilização das enzimas nos processos industriais, a necessidade da busca por novas cepas microbianas produtoras vem crescendo [2,3].

O isolamento de novas cepas produtoras de enzimas envolve o uso das mais variadas fontes. Dentre as fontes de isolamento de micro-organismos encontram-se os manguezais, os quais compreendem ecossistemas litorâneos tropicais e subtropicais que se caracterizam por sua alta produtividade e por seu papel fundamental no histórico de vida de inúmeros organismos marinhos [4]. Nesses ecossistemas, a presença de carangueijos favorece a existência de micro-organismos, uma vez que transportam matéria decomposta das plantas à superfície do sedimento. Micro-organismos residentes de manguezais têm importante papel na ciclagem de nutrientes no sistema, sendo indispensáveis para a sustentabilidade do bioma. A diversa e altamente produtiva atividade microbiana no ambiente transforma a matéria orgânica em fonte de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes utilizados pela vegetação [5,6].

Em consequência à grande biodiversidade associada aos manguezais e à possibilidade real de descoberta de enzimas de interesse comercial, o presente trabalho visa o isolamento de micro-organismos a partir de diferentes fontes de um manguezal sergipano. Nesse estudo também é avaliada a capacidade dos isolados quanto a produção de enzimas amilases, proteases, celulasas e lipases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SELEÇÃO DE BIOMA PARA ANÁLISE

Para a seleção do bioma, foi realizado um mapeamento das áreas de preservação ambiental localizadas no estado de Sergipe. Dentre os critérios adotados, o local selecionado deveria compreender uma área de grande preservação ambiental, uma vez que as células microbianas podem sofrer mutações devido a alterações ambientais decorrentes da degradação humana. Dessa forma, a área selecionada não poderia estar situada próxima à centros urbanos [7].

2.2. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas amostras de solo, lodo, água, caule, vegetação aérea e vegetação rasteira do manguezal selecionado, fazendo o uso de recipientes coletores esterilizados. A coleta foi realizada em fevereiro de 2013 e as amostras, representadas na Figura 1, foram incubadas por 24 horas a temperatura ambiente em tubos de ensaio contendo meio Caldo Nutriente (Himedia®) [8].

2.3. SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

Para a seleção de fungos, uma alçada do material incubado em Caldo Nutriente foi transferida para placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) (Himedia®) com antibiótico amoxicilina 500 mg e ácido clavulônico 125 mg, enquanto que para a seleção de bactérias, uma alçada do mesmo caldo foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (AN) (Himedia®). Ambas as placas foram semeadas por esgotamento e incubadas a 35 °C. As placas de AN foram incubadas por um período de 24 horas e as de BDA foram incubadas por 120 horas.

Após o período de incubação, os micro-organismos foram isolados e as colônias de bactérias e micélios de fungos foram selecionadas de acordo com suas características morfológicas. Além disso, os micro-organismos isolados também foram analisados microscopicamente para verificação de Gram, utilizando técnicas de coloração específica em microscópio ótico modelo BA310 marca MOTIC.

Para a manutenção das cepas bacterianas isoladas, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente inclinado e os fungos isolados foram inoculados em BDA, sendo ambos mantidos a 8 °C. Todos os isolados obtidos também foram mantidos em meio *Skim Milk* 15% (m/v) a -20 °C [8].

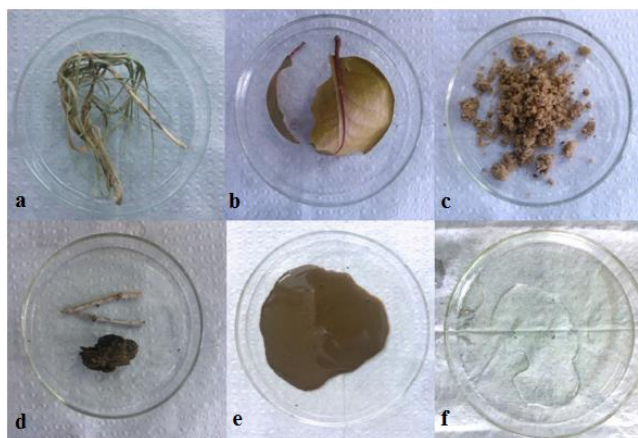


Figura 1: Amostras coletadas do manguezal selecionado, (a) amostra de vegetação rasteira, (b) amostra de vegetação aérea, (c) amostra de solo, (d) amostra de caule, (e) amostra de lodo e (f) amostra de água.

2.4. SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS

2.4.1 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURAS

Para avaliar a produção de enzimas pelos micro-organismos isolados, foram utilizados meios de culturas contendo os substratos indutores específicos para cada enzima de interesse. Com o intuito de determinar a atividade amilolítica, foi utilizado o meio proposto por Hankin e Anagnostakis (1975) [9], o qual foi composto por Ágar Nutriente e 0,2 % (m/v) de amido solúvel, pH 6,0. O meio Ágar Leite (AL), descrito por Giongo (2006) [10], foi preparado para a determinação de atividade proteolítica. Para a determinação da atividade celulolítica, foi preparado um meio de cultura composto por: 7 g/L de KH_2PO_4 ; 2 g/L de K_2HPO_4 ; 0,1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de celulose microcristalina e 15 g/L de Ágar. Para a determinação da atividade lipolítica foi utilizado um meio contendo 18 g/L de Ágar, 10 g/L de Azeite de Oliva e 1 g/L de Tween 80. Os componentes do meio lipolítico foram homogeneizados em liquidificador e após a etapa de esterilização, foi adicionada a Rodamina B a 2% (m/v) previamente esterilizada por filtração, seguindo a metodologia modificada de Dingle et al. (1953) [11]. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 1 atm, 121 °C, durante 15 minutos.

2.4.2 INOCULAÇÃO

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, os isolados a serem testados foram inoculados em um orifício central feito em cada placa de Petri. A inoculação foi realizada em triplicata a fim de obter uma média dos valores de atividade enzimática. Após a inoculação, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 96 horas para posterior análise.

2.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a visualização dos halos de degradação da amilase, foi utilizada uma solução de lugol (I_2/KI) sobre as superfícies das placas incubadas. A formação do complexo amido-Iodo possibilitou a medida dos diâmetros de degradação amilolítica. Para a determinação da atividade

proteolítica, foi possível observar a formação do halo de degradação sem a adição de reagentes. Para a determinação do halo de degradação celulolítico, a técnica proposta por Montenecourt e Eveleigh (1977) [12] foi empregada com a estocagem das placas a 50 °C por 12 horas. No caso dos meios lipolíticos, as placas foram reveladas através de exposição à radiação UV.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis [9] através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE), conforme expresso pela Equação 01.

$$IE = \frac{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO HALO DE DEGRADAÇÃO}}{\text{DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO MICROBIANO}} \quad [01]$$

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e da aplicação do teste de Tukey entre as médias do índice enzimático com uma probabilidade de 10% com o auxílio do programa computacional Minitab 18.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bioma selecionado foi uma área de manguezal ainda preservada, associada à Reserva Biológica de Santa Isabel (REBIO), ao longo do canal do Parapuça, na Região de Ponta dos Mangues, no município de Pacatuba, Sergipe. As áreas de coleta são apresentadas na Figura 2.



Figura 2: Imagens do bioma selecionado para coleta dos micro-organismos selvagens.

A partir da fase de seleção e isolamento dos micro-organismos, foram obtidos 10 fungos e 13 bactérias, sendo que estas apresentaram teste de coloração de Gram positivo em sua totalidade. Os dados de coloração e características morfológicas para bactérias e fungos isolados são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Características morfológicas das bactérias isoladas.

Código	Cor	Textura	Borda	Tipo
ANAE01	Branca	Seca	Uniforme	Cocos
ANAE02	Branca	Seca	Uniforme	Cocos
ANAG01	Creme Clara	Cremosa	Uniforme	Cocos
ANCA01	Creme Clara	Cremosa	Uniforme	Cocos
ANCA02	Creme Clara	Cremosa	Uniforme	Bacilos
ANCA03	Branca	Seca	Não Uniforme	Bacilos
ANCA04	Creme Clara	Cremosa	Uniforme	Bacilos
ANLO01	Amarela	Cremosa	Uniforme	Cocos
ANLO02	Branca	Seca	Não Uniforme	Bacilos
ANRAS01	Laranja	Cremosa	Uniforme	Bacilos
ANRAS02	Branca	Seca	Não Uniforme	Bacilos
ANRAS03	Branca	Seca	Não Uniforme	Bacilos
ANSO01	Branca	Seca	Não Uniforme	Bacilos

Tabela 2: Características morfológicas dos fungos isolados.

Código	Cor	Textura	Borda	Tipo
PDAAE01	Cinza	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDAAG01	Verde-musgo	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDALO01	Preta	Arenosa	Não Uniforme	Filamentoso
PDALO02	Cinza	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDARAS01	Preta	Arenosa	Não Uniforme	Filamentoso
PDARAS02	Cinza	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDASO01	Verde-musgo	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDASO01	Branca	Algodoadada	Uniforme	Filamentoso
PDASO03	Verde-musgo	Aveludada	Uniforme	Filamentoso
PDASO04	Branca	Creмосa	Uniforme	Levedura

A Figura 3 apresenta o resultado obtido para a seleção de micro-organismos produtores de enzimas amilolíticas, onde a região escura identifica a formação do complexo amido-iodo e a região clara evidencia a ação das enzimas amilolíticas.

Também foi possível notar que a grande maioria dos fungos e bactérias foi capaz de crescer e produzir enzimas amilases. A média dos diâmetros de crescimento dos micro-organismos nas placas assim como a média dos seus halos de degradação e os valores encontrados para os índices de atividade enzimática para a amilase, juntamente com os valores de desvio padrão, seguem apresentados nas Tabela 3 e 4 para bactérias e fungos, respectivamente.

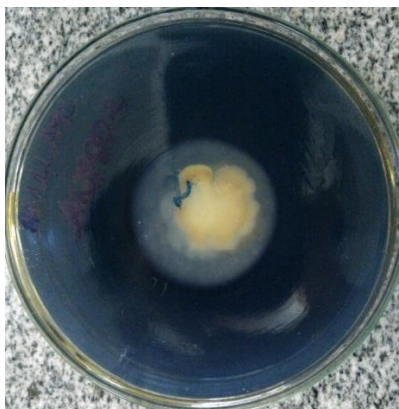


Figura 3: Halo de degradação de Amilase

Tabela 3: Diâmetros médios e valores obtidos para os Índices Enzimáticos da Amilase para as bactérias isoladas¹.

Código	Crescimento (cm)	Halo (cm)	IE
ANAG01	1,07 ± 0,12	2,33 ± 0,06	2,21 ± 0,26 ^{bc}
ANCA01	1,90 ± 0,17	5,30 ± 0,61	2,81 ± 0,50 ^b
ANCA03	4,27 ± 0,21	5,67 ± 0,29	1,33 ± 0,02 ^d
ANLO02	2,17 ± 0,06	3,87 ± 0,06	1,79 ± 0,07 ^{cd}
ANRAS01	0,83 ± 0,15	2,97 ± 0,50	3,57 ± 0,06 ^a
ANRAS02	2,10 ± 0,10	4,30 ± 0,64	2,03 ± 0,38 ^c
ANRAS03	2,03 ± 0,25	4,03 ± 0,21	2,01 ± 0,29 ^c
ANSO01	2,23 ± 0,06	4,27 ± 0,21	1,97 ± 0,15 ^{cd}

1: Médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,1$)

Tabela 4: Diâmetros médios e valores obtidos para os Índices Enzimáticos da Amilase para os fungos isolados¹.

Código	Crescimento (cm)	Halo (cm)	IE
PDAAG01	1,73 ± 0,12	2,27 ± 0,25	1,31 ± 0,18 ^a
PDARAS01	2,70 ± 0,21	2,93 ± 0,25	1,24 ± 0,02 ^a
PDASO02	3,47 ± 0,06	3,73 ± 0,12	1,08 ± 0,05 ^a
PDASO03	1,23 ± 0,06	1,47 ± 0,06	1,19 ± 0,05 ^a
PDASO04	0,7 ± 0,26	0,93 ± 0,12	1,42 ± 0,37 ^a

1: Médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,1$)

Os micro-organismos PDAAE01 e PDASO01 não apresentaram crescimento no meio composto de amido. ANAE01, ANAE02, ANCA02, ANCA04, ANLO01, PDALO01, PDALO02 e PDARAS02 cresceram significativamente, porém não produziram enzimas capazes de degradar o amido presente no meio.

Nas placas contendo o meio AL, para degradação de proteínas por proteases, foi observado que houve um crescimento significativo de bactérias e fungos, assim como uma produção satisfatória da enzima. As Tabelas 5 e 6 apresentam os diâmetros de crescimento e degradação e os índices enzimáticos (IE) para a protease, juntamente com os valores de desvio padrão, e a Figura 4 representa o meio AL degradado.

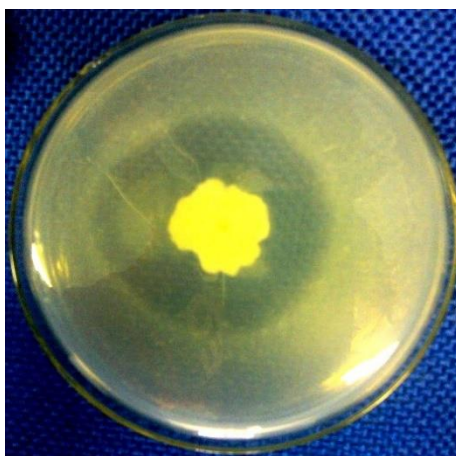


Figura 4: Halo de degradação de Protease

Tabela 5: Diâmetros médios aproximados e IE da enzima Protease para as bactérias isoladas¹.

Código	Crescimento (cm)	Halo (cm)	IE
ANAE01	0,73 ± 0,06	2,33 ± 0,29	3,18 ± 0,36 ^{ab}
ANCA01	0,90 ± 0,17	3,47 ± 0,06	3,95 ± 0,78 ^{ab}
ANCA02	0,83 ± 0,21	4,23 ± 0,75	5,30 ± 1,58 ^a
ANCA03	1,70 ± 0,44	3,43 ± 0,12	2,11 ± 0,55 ^b
ANCA04	0,87 ± 0,47	3,67 ± 0,45	5,26 ± 2,96 ^a
ANLO02	1,83 ± 0,21	4,50 ± 0,26	2,47 ± 0,14 ^{ab}
ANRAS01	0,73 ± 0,15	3,33 ± 0,29	4,63 ± 0,64 ^{ab}
ANRAS02	1,57 ± 0,40	4,10 ± 0,17	2,73 ± 0,68 ^{ab}
ANRAS03	1,60 ± 0,26	4,67 ± 0,29	2,95 ± 0,29 ^{ab}
ANSO01	2,27 ± 0,57	4,27 ± 0,21	1,97 ± 0,53 ^b

¹ Médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,1$).

Tabela 6: Diâmetros médios aproximados e IE da enzima Protease para os fungos isolados¹.

Código	Crescimento (cm)	Halo (cm)	IE
PDAAG01	1,93 ± 0,25	3,47 ± 0,06	1,81 ± 0,21 ^{ab}
PDALO01	3,30 ± 0,10	5,80 ± 0,44	1,76 ± 0,08 ^{ab}
PDARAS01	3,50 ± 0,10	4,43 ± 0,12	1,27 ± 0,02 ^{ab}
PDARAS02	1,63 ± 0,38	3,33 ± 0,23	2,11 ± 0,48 ^a
PDASO02	3,83 ± 0,47	4,20 ± 0,46	1,10 ± 0,02 ^b

¹ Médias de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,1$).

O micro-organismo ANAG01 não apresentou crescimento no meio AL. Os isolados ANAE02, ANLO01, PDAAE01, PDALO02, PDASO01, PDASO03 e PDASO04 apresentaram crescimento no meio proteico. Contudo, os isolados não exibiram capacidade de degradação do mesmo.

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos micro-organismos [13, 14].

Lealem e Gashe (1994) [15] estabelecem que para que um micro-organismo seja considerado como um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, é necessário que o seu IE seja maior ou igual a 2,0. Dessa forma, foi possível classificar os micro-organismos ANAG01, ANCA01, ANRAS01 e ANRAS02 como bons produtores de amilase microbiana, sendo o ANRAS01 o melhor entre eles, visto seu maior valor de IE (Tabela 3). Os fungos listados na Tabela 4, apesar de terem apresentado capacidade de produção da enzima, não podem ser considerados como bons produtores, visto seus baixos valores de IE e, por isso, não são viáveis para a utilização industrial.

A partir da análise das Tabelas 5 e 6, apenas a bactéria ANSO01 não pode ser considerada como produtora potencial da enzima protease e dentre as restantes, a bactéria ANCA02 foi a que apresentou melhor capacidade degradante de proteínas. Além disso, o único fungo considerado como viável para produção da enzima em questão é o isolado PDARAS02, uma vez que os demais apresentaram valores de IE abaixo de 2,0 [15].

De acordo com a análise para determinação enzimática de celulase, não foi possível observar crescimento de bactérias nos meios à base de celulose microcristalina. Porém, foi observado um crescimento significativo de fungos nesse meio. Entretanto, não foi possível detectar o halo de degradação da celulose desses isolados a partir do método descrito por Stamford e Stamford (1998) [16], que também não obtiveram resultado satisfatório para celulase. Souza et al. (2009) [3] conseguiu detectar atividade celulolítica a partir de fungos isolados do solo de manguezal da Reserva do Sapiranga fazendo uso do mesmo meio de cultura utilizado neste trabalho, porém com

agente revelador Vermelho de Congo, o que pode ter sido um diferencial para os resultados. Além disso, considerando a força iônica da água do mar (aproximadamente 0,700), existe uma grande discrepância em relação ao meio de cultura utilizado neste trabalho que apresenta força iônica igual a 0,107, o que também pode ter sido um fator importante para a ausência de crescimento e atividade de alguns micro-organismos.

Nos meios preparados para determinação de atividade lipolítica, não foi observado nenhum crescimento de micro-organismos e, portanto, nenhuma degradação, tanto para os fungos quanto para as bactérias isoladas. Isso pode ser explicado pelo fato de que emulsificadores como Tweens, mono e diacilgliceróis devem ser evitados na composição do meio de cultura, visto que sua presença no meio pode afetar a síntese e a atividade da lipase [17, 18]. Segundo Colen (2006) [2], outro fator que pode dificultar a obtenção de enzimas lipolíticas é a ausência de peptona no meio de cultura.

Embora seja uma área de pesquisa em crescimento, ainda são poucos os estudos acerca de isolamento de micro-organismos produtores de enzimas industriais a partir de manguezais. Dentre alguns trabalhos associados ao tema, podem ser destacados alguns estudos no território nacional e no exterior. Dentre eles, os estudos de Dias (2008) [19] e Castro [20], que conseguiram isolar amilase e lipase a partir de sedimentos do manguezal da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP e de Bertioiga, SP.

Correia et al. (2014) [21] identificaram bactérias produtoras de amilase, protease e lipase, dentre outras enzimas a partir de sedimentos de mangue da Lagoa do Araçá, em Pernambuco, fazendo uso do mesmo método de determinação de atividade enzimática que o presente artigo. Apesar da produção observada de lipase, o autor considerou o resultado como sendo baixo e relacionado à alimentação da Lagoa pelo fluxo de entrada e saída de água proveniente do Rio Tejipió, o que pode fazer com que a Lagoa contenha sedimentos ou micro-organismos específicos capazes de apresentar a atividade lipolítica.

Na Índia, Joel e Bhimba (2012) [22] isolaram micro-organismos produtores de amilases a partir de plantas de manguezal do Distrito de Chimdabaram, Sahoo et al. (2014) [23] isolaram colônias de fungos de sedimentos de cinco manguezais de diferentes áreas do estado de Odisha e Venugopal e Saramma (2006) [24] conseguiram isolar um micro-organismo de sedimento do manguezal de Cochin, capaz de produzir uma protease alcalina extracelular, a qual pode ser incorporada em detergentes industriais. Também na Índia, Behera et al. (2016) [25], isolaram bactérias de manguezal capazes de produzir enzimas celulolíticas. Adicionalmente, Maria et al. (2005) [26] isolou fungos capazes de produzir as enzimas estudadas nesse trabalho a partir de manguezais da costa do sudoeste indiano.

4. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos no decorrer desse estudo, é possível corroborar a importância do manguezal como fonte microbiana, visto a quantidade de micro-organismos isolados obtidos e a capacidade dos mesmos em produzir catalisadores biológicos.

Dentre os micro-organismos isolados, a bactéria ANRAS01 pode ser destacada como o de melhor comportamento degradante para meios amilolíticos com IE de 4,6. Nenhum fungo isolado apresentou Índice Enzimático $\geq 2,0$, não sendo, portanto, viáveis economicamente para uso industrial.

Para os meios proteolíticos, a bactéria de maior IE foi a ANCA02, com um valor de 5,08 e o único fungo considerado como bom produtor foi o PDARAS02 de IE 2,04.

Não foram detectadas atividades enzimáticas para os meios celulolíticos e lipolíticos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe pela disponibilização do laboratório e materiais para a realização das atividades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência; 2008. 506 p.
2. Colen G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases [tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006. 206 p.
3. Souza CG, Braga RM, Amorim MV, Faheina Jr GS, Lopes VR, Martins SC, Pinto GA, Martins CM. Atividade celulolítica de fungos isolados do solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga. In: XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo; 2009 Aug 2-7; Fortaleza, CE. Fortaleza (CE): Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; c2009. p. 1-5.
4. Branco LHZ, Moura AN, Silva AC, Oliveira MCB. Biodiversidade e considerações biogeográficas das Cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. Acta Bot. Bras. 2003 Dez;17(4):585-96, doi:10.1590/S0102-33062003000400010.
5. Bashan Y, Holguin G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. Trees. 2002 Mar;16:159-66, doi:10.1007/s00468-001-0152-4.
6. Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystems: an overview. Biol Fertil Soils. 2001 Feb;33(4):265-78, doi:10.1007/s003740000319.
7. Infante CS, Pinto APF, Vieira RF, Silva CMMS, Ligo MAV. Impacto da contaminação de sedimento de mangue com óleo na atividade de microrganismos. In: II Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica; 2008; Campinas, SP. Campinas (SP): ITAL/IAC; Jaguariuna (SP): Embrapa Meio Ambiente; 2008. P. 1-6.
8. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimento. São Paulo: Varela; 1997. 259p.
9. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 1975 May;67(3):597-607, doi:10.2307/3758395.
10. Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. 95 p.
11. Dingle J, Reid WW, Solomons GL. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. J Sci Food and Agric. 1953 Feb;4(3):149-55, doi:10.1002/jsfa.2740040305.
12. Montencourt BS, Eveleigh DE. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. Appl Environ Microbiol. 1977 Jan;33(1):178-83.
13. Ceska M. Enzyme catalysis of solidified media. Eur J Biochem. 1971 Sep;22(2):186-92, doi:10.1111/j.1432-1033.1971.tb01531.x
14. Lin JE, Chang DCN, Shen GJ. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. Biotechnol Tech. 1991 Jul;5(4):275-80, doi: 10.1007/BF02438662.
15. Lealem F, Gashe BA. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):348-52, doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03084.x.
16. Stamford TLM, Araújo JM, Stamford NP. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). Ciênc Tecnol Aliment. 1998 Oct;18(4):382-5, doi:10.1590/S0101-20611998000400004.
17. Hadeball W. Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from Yeasts (Review). Acta Biotechnol. 1991 Jan;11(2):159-67. doi:10.1002/abio.370110217.
18. Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 1999 Aug;39(2):165-87, doi: 10.1080/10408399908500492.
19. Dias ACF. Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da ilha do Cardoso (Cananéia – SP) [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008. 61 p.
20. Castro RA. Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertiooga-SP [dissertação]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo; 2011. 93 p.
21. Correia JLA, Santos TRS, Silva Jr AA, Marques OM. Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química; 2014 Oct 19-22; Florianópolis, SC. Florianópolis (SC): Blucher Chemical Engineering Proceedings; c2015. p. 1567-74.
22. Joel EL, Bhimba BV. Production of alpha amylase by mangrove associated fungi *Pestalotiopsis microspora* strain VB5 and *Aspergillus oryzae* strain VB6. Indian J Mar Sci. 2012 Jun;41(3):279-83.
23. Sahoo K, Dhal NK, Das R. Production of amylase enzyme from mangrove fungal isolates. Afr J Biotechnol. 2014 Nov;13(46):4338-46, doi:10.5897/AJB2013.13424.

24. Venugopal M, Saramma AV. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 2006 Jun;41(6):1239-43, doi:10.1016/j.procbio.2005.12.025.
25. Behera BC, Mishra RR, Singh SK, Dutta SK, Thatoi H. Cellulase from *Bacillus licheniformis* and *Brucella* sp. isolated from mangrove soils of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Biocatal. Biotransformation.* 2016 Aug;34(1):44-53, doi:10.1080/10242422.2016.1212846.
26. Maria GL, Sridhar KR, Ravijara NS. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *J Agr Tech.* 2005 Oct;1:67-80.